



Remoção de bactérias resistentes a antibióticos veterinários em Zonas Húmidas Construídas

**Dissertação do Mestrado em Toxicologia e Contaminação
Ambientais**

Iolanda Patrícia Lourinha Ribeiro

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto, 29 de Setembro de 2016



Remoção de bactérias resistentes a antibióticos veterinários em Zonas Húmidas Construídas

**Dissertação do Mestrado em Toxicologia e Contaminação
Ambientais**

Iolanda Patrícia Lourinha Ribeiro

Orientada por:

Ana Paula Mucha, Ph.D. Investigadora Auxiliar do CIIMAR

Marisa Almeida, Ph.D. Investigadora Auxiliar do CIIMAR

*Dissertação submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar & Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto, Universidade do Porto para obtenção do grau de
Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais, Área de especialização em
Tecnologias de Remediação Ambiental*

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto, 29 de Setembro de 2016

*Importante não é ver o que ninguém viu, mas sim, pensar o que
ninguém nunca pensou sobre algo que todo o mundo vê.*

- Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Como o mundo dá voltas, a Vida também as dá. Mesmo quando tudo parecia estar contra, houve sempre forma dos problemas serem contornados. Os últimos três anos nem sempre foram fáceis, todos temos altos e baixos, mas com a ajuda das pessoas certas na altura certa orgulho-me de todo o trabalho que desenvolvi.

À Doutora Ana Paula Mucha, obrigada pela oportunidade, orientação e apoio ao longo destes três anos. Sem a sua paciência e compreensão não teria sido possível concluir mais esta etapa.

À Doutora Cristina Marisa Almeida, minha coorientadora, pela sua disponibilidade, espírito crítico e apoio incondicional ao longo de todo o trabalho.

Especial agradecimento à Doutora Fátima Carvalho, pelos seus conhecimentos, disponibilidade e por se ter prontificado a ajudar-me com a execução de técnicas de isolamento de bactérias.

Às minhas colegas, Filipa Santos e Catarina Ferreira pela sua boa disposição e, por toda a ajuda ao longo das experiências laboratoriais.

A toda a equipa do EcoBioTec, pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram e me fazerem sentir parte da “família”.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento parcial no âmbito do programa PT2020 e pelo programa estruturado INNOVMAR - Inovação e Sustentabilidade na gestão e exploração dos recursos marinhos (NORTE-01-0145-FEDER-000035); apoiado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020), através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Pai, Mãe; só posso dizer muito obrigada, obrigada por tudo o que fizeram por mim e por tudo o que me proporcionaram. Sem o vosso apoio incondicional, suporte e paciência de santo ao longo de todo o meu percurso académico, não teria sido possível chegar onde cheguei.

À minha Avó, um beijo do tamanho do mundo, pois sei o quanto significa para ti ter concluído os meus estudos. Sei que o Avô estaria bastante orgulhoso e de peito cheio.

Ao meu irmão Marcos, apesar de nem sempre termos as mesmas opiniões obrigada por estares presente sempre que precisei.

Obrigada aos Amigos de sempre, por partilharem continuamente as experiências boas e más comigo, e que em parte contribuíram para quem sou hoje.

Em especial à Tatiana por me acompanhar há 18 anos, que mesmo longe está tão perto. Obrigada Sofia e Hélder, por serem melgas e me incentivarem a nunca desistir.

Para terminar, um grande e especial obrigada ao Pedro, por fazer parte da minha vida e me acompanhar neste percurso há já 11 anos. Por acreditares em mim mesmo quando eu não o fazia, por seres incansável e me incentivares constantemente. Sem o teu optimismo e a tua confiança cega teria sido bem mais difícil.

Resumo

Os medicamentos veterinários e os seus compostos activos podem entrar nos sistemas aquáticos através, por exemplo, de descargas de efluentes provenientes de explorações agro-pecuárias, como as suiniculturas. Destes, os antibióticos são os que suscitam maior preocupação, isto porque podem promover a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos (BRA) nas comunidades microbianas presentes no ecossistema. Já foi proposto que as Zonas Húmidas Construídas (ZHC) podem ser usadas na redução de diversos poluentes em efluentes provenientes de suiniculturas, como é o caso dos antibióticos. Estes sistemas simulam as zonas húmidas naturais e têm como vantagens o facto de serem economicamente viáveis e de fácil reprodução/manuseamento. O presente estudo teve como objectivo avaliar o potencial das ZHC para a remoção de BRA de águas residuais de suiniculturas. Para simular uma ZHC, foram montados microcosmos (dimensões: 0.4 m x 0.3 m x 0.3 m) com *Phragmites australis* e introduzida água residual de uma suinicultura dopada (ou não) com 100 µg/L de enrofloxacin e/ou 100 µg/L ceftiofur, dois dos antibióticos utilizados na indústria pecuária. A água residual foi tratada durante um ciclo de uma semana. Após o ciclo de uma semana, a água residual foi removida e substituída por água nova (dopada ou não), o processo repetiu-se durante 20 semanas. Foram recolhidas amostras nas semanas 1, 2, 4, 8, 14, 18 e 20 para determinar a remoção de três grupos de BRA (bactérias Heterotróficas, Coliformes e *Enterococcus*), e foi efectuada a caracterização microbiana por cultura em placa. Na água residual inicial os valores de BRA variaram entre 0 e 11% para as bactérias Heterotróficas, de 0 a 28% para os Coliformes e de 0 a 37% para os *Enterococcus*. No final da experiência a eficiência de remoção de BRA foi superior a 51% para as bactérias Heterotróficas, superior a 99% para as Coliformes e superior a 97% para os *Enterococcus*. Os resultados obtidos indicam que as ZHC podem ser uma alternativa válida para a remoção de BRA, reduzindo o risco que a descarga de efluentes de suiniculturas pode acarretar para o meio ambiente.

Abstract

Veterinary pharmaceuticals and their active compounds can enter into the aquatic systems through, for instance, discharges of effluents from livestock industry. Among these, antibiotics are of main concern, as they can promote the occurrence of antibiotic resistant bacteria (ARB) among the environmental communities. It has been proposed that Constructed Wetlands (CWs) can be used in the reduction of various pollutants in effluents from livestock industry, including antibiotics. These systems that simulate some of the removing processes occurring in natural wetlands, present several advantages, such as low implementation costs and facility of management. The present study aimed to evaluate the potential of CWs for the removal of ARB from swine production wastewater. To simulate a CW system, microcosms (dimensions: 0.4 m x 0.3 m x 0.3 m) were assembled with *Phragmites australis* and fed with swine production wastewater doped or not with 100 µg/L of enrofloxacin and/or 100 µg/L of ceftiofur, two antibiotics commonly used in livestock industry. Wastewater was treated during one-week cycle. After the one-week cycle, wastewater was removed and replaced by new wastewater (doped or not), the process being repeated during 20 weeks. Treated wastewater samples were collected at weeks 1, 2, 4, 8, 14, 18 and 20 to determine the removal of three groups of ARB (heterotrophic, enterobacteria and enterococci), which was estimated in plate culture media. Initial livestock wastewater presented values of ARB that range from 0 to 11% for heterotrophic bacteria, from 0 to 28% for enterobacteria and from 0 to 37% for enterococci. At the end of the experiment the removal efficiency was higher than 51% for heterotrophic bacteria, 99% for coliforms and 97% enterococci. Therefore, CWs can be a valuable alternative to remove ARB from swine production wastewater, reducing the risk that the release of these effluents might pose to the environment.

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	VI
Abstract.....	VIII
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XVII
Abreviaturas.....	XVIII
1. Introdução	2
1.1 Geral.....	2
1.2 Fármacos Veterinários.....	4
1.3 Bactérias resistentes a antibióticos (BRA)	5
1.4 Estações de tratamento de águas residuais	7
1.5 Zonas Húmidas Construídas (ZHC)	9
1.6 Objectivos	13
2. Métodos	16
2.1 Amostragem.....	16
2.2 Configuração dos microcosmos	17
2.3 Funcionamento dos microcosmos e recolha de amostras.....	18
2.4 Caracterização Microbiológica por Placas	20
2.5 Isolamento Microbiológico	21
2.6 Análise Estatística.....	22
3. Resultados	25
3.1 Efluente Inicial.....	25
3.1.1 Unidades Formadoras de Colónias (UFC).....	Erro! Marcador não definido.
3.1.2 Resistência a antibióticos	28
3.2 Efluente Tratado.....	29
3.2.1 Heterotróficas.....	29
3.2.1.1 Unidades Formadoras de Colónias (UFC).....	29
3.2.1.2 Resistência a antibióticos	33

3.2.1.3 <i>Remoção bacteriana</i>	35
3.2.2 Coliformes	36
3.2.2.1 <i>Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i>	36
3.2.2.2 <i>Resistência a antibióticos</i>	40
3.2.2.3 <i>Remoção bacteriana</i>	42
3.2.3 Enterococos	43
3.2.3.1 <i>Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i>	43
3.2.3.2 <i>Resistência a antibióticos</i>	47
3.2.3.3 <i>Remoção bacteriana</i>	49
4. Discussão.....	52
4.1 Abundância Bacteriana	52
4.2 Resistência Bacteriana	53
4.3 Remoção Bacteriana	54
5. Conclusão	57
Referências Bibliográficas.....	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplo de uma Zona Úmida Construída usada para o tratamento de águas residuais.....	9
Figura 2 – Representação esquemática do escoamento superficial	11
Figura 3 – Representação esquemática do escoamento subsuperficial horizontal.....	11
Figura 4 – Representação esquemática do escoamento subsuperficial vertical.....	12
Figura 5 – Margens do estuário do rio Lima.	16
Figura 6 – Montagem dos sistemas de microcosmos	17
Figura 7 – Diagrama de montagem dos microcosmos.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 8 – Disposição dos microcosmos em triplicado, de acordo com o diagrama apresentado.....	19
Figura 9 – Exemplo de meios de cultura	20
Figura 10 – Riscados em meio de cultura de PCA.....	21
Figura 11 – Abundância de bactérias Heterotróficas, Coliformes e Enterococos, totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), no efluente inicial das diferentes semanas de tratamento (S0 – S19).	27
Figura 12 – Taxa de resistência a antibióticos dos diferentes grupos de bactérias (Heterotróficas, Coliformes e Enterococos), totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) presentes no efluente inicial, ao longo das semanas de tratamento (S0 – S19).....	28
Figura 13 – Abundância de bactérias Heterotróficas totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).....	29
Figura 14 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente	

dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 30

Figura 15 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 31

Figura 16 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 32

Figura 17 – Taxa de resistência a enrofloxacin para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 33

Figura 18 – Taxa de resistência a ceftiofur para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 34

Figura 19 – Taxa de resistência à mistura de enrofloxacin e ceftiofur para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 34

Figura 20 – Abundância de Coliformes totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef

– adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 36

Figura 21 – Abundância de Coliformes resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 37

Figura 22 – Abundância de Coliformes resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 38

Figura 23 – Abundância de Coliformes resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 39

Figura 24 – Taxa de resistência a enrofloxacin para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 40

Figura 25 – Taxa de resistência a ceftiofur para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 41

Figura 26 – Taxa de resistência a mistura de enrofloxacin e ceftiofur para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 41

Figura 27 – Abundância de *Enterococcus* totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 43

Figura 28 – Abundância de *Enterococcus* resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 44

Figura 29 – Abundância de *Enterococcus* resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 45

Figura 30 – Abundância de *Enterococcus* resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 46

Figura 31 – Taxa de resistência a enrofloxacin para os *Enterococcus* presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 47

Figura 32 – Taxa de resistência a ceftiofur para os *Enterococcus* presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur). 48

Figura 33 – Taxa de resistência a mistura de enrofloxacin e ceftiofur para os *Enterococcus* presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das

diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).....48

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores obtidos para os diferentes parâmetros analisados no Efluente Inicial.	25
Tabela 2 – Contagem de UFC presentes no efluente inicial ao longo das 20 semanas de tratamento, para os diferentes grupos de BRA (Heterotróficas, Coliformes e Enterococcus) cultivadas na ausência (totais) e na presença dos diferentes antibióticos (Enr, Cef e Mix), expressos em log ₁₀ UFC/100ml.	26
Tabela 3 – Taxa de Remoção (máximo, mínimo e média) de bactérias Heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.....	35
Tabela 4 – Taxa de Remoção (máximo, mínimo e média) de Coliformes totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.....	42
Tabela 5 – Taxa de Remoção (máximo, mínimo e média) de Enterococcus totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.....	49

Abreviaturas

BRA – Bactérias Resistentes a Antibióticos

Cef – Ceftiofur

Col – Coliformes

Enr – Enrofloxacin

Ent – Enterococcus

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

Het – Bactérias Heterotróficas

Mix – Mistura de Enrofloxacin e Ceftiofur

PCA – Plate Count Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

ZHC – Zona Húmida Construída

ZHN – Zona Húmida Natural

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1 Geral

Cada vez mais se presta atenção à poluição ambiental, e aos tipos de contaminantes a que somos expostos. Surge assim, uma categoria de contaminantes denominados de emergentes. Trata-se de compostos de diferentes origens e natureza química, sobre os quais pouco ou nada se sabe e que passam despercebidos no ambiente, poluentes sobre os quais não existe legislação concreta (Alda e Barceló, 2008).

A contaminação do ambiente aquático por produtos químicos continua a ser um grande problema para a sociedade em geral. Se no campo profissional o interesse é proteger o meio ambiente envolvente, já a nível público a importância das águas doces recaem sobre o facto de serem uma fonte de alimento, de água potável e recreação (Kim e Aga, 2007).

Entre os que requerem mais atenção encontram-se os compostos farmacêuticos presentes no meio aquático. O facto de estes fármacos serem encontrados em águas residuais, e a sua remoção ser ineficiente, é a principal razão para o seu estudo eminente (Carvalho *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2012). Estes compostos não necessitam ser persistentes para causarem efeitos adversos, tendo em conta a sua introdução contínua no meio ambiente, o seu elevado consumo e a elevada produção dos mesmos (Alda e Barceló, 2008).

Os produtos farmacêuticos são classificados como poluentes emergentes, sendo utilizados em grande escala tanto na medicina humana como na veterinária. Estes compostos são produzidos para possuírem biodegradabilidade baixa e, alta solubilidade em água (Fernandes *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2009).

Os antibióticos são os fármacos que mais causam preocupação no ambiente, tendo aumentado o seu estudo nos últimos anos. O uso indiscriminado destes compostos, juntamente com a sua posterior descarga para o ambiente, está a provocar uma resistência acelerada por parte de alguns microrganismos (Villa, 2012).

Apesar dos fármacos veterinários serem utilizados numa proporção semelhante às de consumo humano, a pesquisa da sua emissão e efeitos no ambiente tem sido negligenciada ao longo dos tempos (Carvalho, 2012).

Estes fármacos são usados no mundo inteiro como forma de prevenção da saúde animal, e para evitar perdas económicas avultadas, garantindo um fornecimento seguro de alimento.

A remoção destes compostos é ineficiente em águas residuais, tendo em conta que as estações de tratamento urbanas convencionais não se encontram preparadas para degradar completamente este tipo de compostos (López-Peñalver *et al.*, 2010; Pruden *et al.*, 2006).

Surgiu assim uma opção mais viável e rentável, em que é possível obter efluentes de alta qualidade utilizando menos energia (Helt *et al.*, 2012), através da construção de zonas húmidas construídas (ZHC), ou seja, a recriação de um ecossistema natural de zonas húmidas capaz de remover poluentes que as Estações convencionais de tratamento de águas residuais (ETAR) não são capazes.

Uma ZHC consiste numa zona húmida artificial criada para tratamento descargas antrópicas, como as águas residuais, e que pode simultaneamente funcionar como um novo habitat para a vida selvagem nativa e migratória. Estes sistemas atuam como um biofiltro, removendo sedimentos e poluentes. A vegetação de uma ZHC fornece um substrato rico (raízes, caules e folhas) onde os microrganismos podem crescer à medida que vão decompondo compostos orgânicos.

A escolha das plantas a serem usadas é bastante importante, pois têm de ser capazes de sobreviver em ambientes alagados e tóxicos de forma a remover, imobilizar ou tornar inofensivos para o ecossistema compostos orgânicos e inorgânicos, através da sua captação/degradação (Calheiros *et al.*, 2006).

A planta *Phragmites australis* é das mais usadas em Portugal, para o tratamento de águas residuais domésticas e industriais (Calheiros *et al.*, 2006). Também já mostrou ser capaz de remover fármacos veterinários de águas residuais (Carvalho *et al.*, 2013).

Os compostos escolhidos para este estudo foram a enrofloxacina (do grupo das fluoroquinolonas) e o ceftiofur (grupo das cefalosporinas), tendo em conta estudos prévios (Carvalho, 2012), e ainda pelo facto de representarem diferentes famílias de fármacos amplamente usados na indústria pecuária em Portugal.

Devido à falta de informação sobre a resistência a antibióticos veterinários e à fitorremediação destes produtos, existe uma necessidade de elaborar mais estudos sobre este tema. Apesar de já existirem estudos sobre resistência a antibióticos e sobre fitorremediação, estes focam-se mais nos produtos de uso humano e nos de cuidados pessoais, negligenciando o fármacos veterinários.

1.2 Fármacos Veterinários

Nos últimos anos, tem-se prestado mais atenção à poluição ambiental, e aos contaminantes a que estamos expostos.

Entre os fármacos veterinários usados, podemos encontrar diferentes categorias farmacológicas, tais como, anti-inflamatórios, anestésicos, anti-sépticos, antibióticos, broncodilatadores e antifúngicos, sendo administrados através da alimentação, água, injeção, tópica, oral entre outros (Carvalho, 2012). Na indústria pecuária os antibióticos são o grupo de fármacos mais utilizados mundialmente, sendo também dos que mais preocupações provocam. Têm sido fortemente usados na indústria alimentar animal para tentar evitar perdas económicas e garantir a qualidade do produto, como promotores de crescimento e para terapia/prevenção de possíveis doenças (Boxall *et al.*, 2003; Carvalho, 2012; Liu *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014).

Segundo Carvalho (2012), foi estimado que cerca de 75% dos antibióticos administrados a animais não são absorvidos, mas sim excretados. Já Liu *et al.* (2013), Li *et al.* (2014) e Ma *et al.* (2014), afirmam que 30 – 90% desses mesmos antibióticos são excretados de forma não alterada ou como metabolitos, na urina e nas fezes para os sistemas de esgotos. Investigações feitas anteriormente mostram que entre os antibióticos mais comuns na indústria pecuária estão as tetraciclinas, as sulfonamidas e as fluoroquinolonas (Liu *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, Li *et al.* (2014), referem que os compostos farmacêuticos e os seus metabolitos excretados podem desencadear potenciais riscos para a saúde humana, como é o caso de reacções inflamatórias no fígado. Ou para a vida aquática, onde pode ocorrer a feminização dos peixes machos, a diminuição da diversidade do plâncton, ou o desenvolvimento de resistência dos organismos patogénicos.

A preocupação aumentou quando foi detectada a presença de fármacos e a sua habilidade de pseudo-persistir no ambiente, especialmente em recursos de água doce (Carvalho *et al.*, 2013). Podendo também entrar no ambiente através de descargas de efluentes nas estações de tratamento de águas residuais, ou de utilização de estrume (fezes excretadas) para a fertilização do solo, alcançando as águas de superfície e as subterrâneas, afectando todo o ecossistema, assim como a saúde humana (Carvalho, 2012). Posto isto, é mais do que obvio que são necessários mais estudos neste campo científico, para tentar descobrir mais a cerca desta temática.

1.3 Bactérias resistentes a antibióticos (BRA)

Com a utilização massiva de antibióticos pela nossa sociedade, tanto em humanos como nos animais, estes tem-se tornado numa das maiores preocupações da saúde ambiental. Para além de desenvolverem resistência nas comunidades microbianas, potencia a propagação e evolução da resistência no ambiente. A sua presença tem vindo a provocar um aumento gradual da resistência nas bactérias presentes nos meios contaminados (Joy *et al.*, 2014).

Os animais são um dos maiores produtores de resíduos, gerando antimicrobianos em massa. Os fármacos são utilizados como uma forma de prevenção, ou seja, promoção de crescimento, profilaxia e ainda como terapia para algumas doenças. São adicionados às rações (diárias), no entanto, não são completamente absorvidos durante a digestão sendo posteriormente expelidos quase intactos (Joy *et al.*, 2014). No entanto, os antibióticos são pouco absorvidos pelos animais, e 30 – 90% de todos esses antibióticos adicionados às rações são excretados de forma não alterada ou de metabolitos. (Liu *et al.*, 2013)

Entre a comunidade científica tem sido sugerido que ambientes ricos em nutrientes, tais como os efluentes, oferecem óptimas condições na promoção de processos de transferência horizontal de genes. Tendo isto em conta, as instalações de tratamento de águas residuais, onde altas doses de bactérias sensíveis e tolerantes a antibióticos são misturadas entre si, são consideradas *hot-spots* de propagação de resistência a antibióticos (Manaia *et al.*, 2010).

Existem cada vez mais preocupações em relação aos resíduos resistentes a antibióticos em águas residuais de suiniculturas; em que estes resíduos têm a capacidade de perturbar o balanço ecológico natural e desencadear um aumento de bactérias resistentes no ambiente (Chen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Martinez, 2009).

Estudos anteriores dão apoio a esta teoria, e demonstram que as ETAR podem fornecer de forma permanente para o ambiente bactérias resistentes a antibióticos (Kim and Aga 2007; Manaia *et al.*, 2010).

As ETAR são consideradas *hot-spots* importantes na propagação da resistência de antibióticos. De acordo com Novo *et al.* (2013), existem três argumentos que suportam a afirmação anterior.

O primeiro refere-se ao facto de os resíduos de antibióticos e outras substâncias com potencial de pressão selectiva, bactérias resistentes a antibióticos são altamente descarregadas para os sistemas de esgotos municipais.

O segundo, refere-se às condições oferecidas aos microrganismos durante o processo de tratamento das águas residuais, que podem favorecer tanto a selecção como a transferência horizontal de determinados genes resistentes a antibióticos.

O terceiro e último, refere-se à observação a nível mundial, isto é, o tratamento de águas residuais independentemente da sua eficiência ou condições operacionais, leva a que os efluentes finais contenham bactérias resistentes a antibióticos, por vezes, percentagens mais elevadas do que no efluente inicial. (Novo *et al.*, 2013)

Baquero et al. (2008) fizeram um levantamento acerca da presença de antibióticos em águas ambientais e a sua resistência a antibióticos, e chegaram à conclusão que são necessários mais estudos nesta temática, e ainda, é necessário desenvolver um método mais económico e confiável para a remoção de BRA presentes nos efluentes tratados.

Luczkiewicz et al. (2010) desenvolveram um estudo em águas residuais urbanas com o objectivo de detectar a resistência antimicrobiana utilizando como indicadores fecais as bactérias *E. coli* e *Enterococcus*, normalmente presentes nestas águas. Concluindo que as bactérias fecais presentes nas águas residuais tratadas periodicamente com processos de lamas activadas, atingiram 90% do número total das bactérias indicadoras com padrões de resistência. As bactérias resistentes ao serem introduzidas e/ou seleccionadas em ambientes aquáticos, podem ocorrer mudanças nos ecossistemas naturais dos receptores.

No caso de *Falcone-Dias et al.* (2012) o estudo tinha como intuito provar o potencial da água engarrafada como fonte de resistência bacteriana a antibióticos. Apesar da maioria da população acreditar que a água engarrafada é superior à água canalizada, relativamente à quantidade de microrganismos nela presente tal não é verdade.

De acordo com *Leclerc e Costa* (1998), a água mineral natural não está totalmente livre de bactérias, sendo que é possível alcançar-se contagens entre os $10^4 - 10^5$ CFU/ml poucos dias após o seu engarrafamento.

Como se pode observar, tendo em conta os diferentes estudos efectuados anteriormente, podemos afirmar que ainda não existe muita informação e é necessário investigar mais sobre a temática da resistência a antibióticos. Focando-nos mais na vertente veterinária, visto haver mais uso e sem grande controlo.

1.4 Estações de tratamento de águas residuais

Actualmente, os tratamentos das águas residuais mais convencionais não estão preparados para a eliminação eficaz de produtos farmacêuticos, não sendo estes completamente removidos.

Estão continuamente a ser introduzidos fármacos nas águas residuais, sob a forma de metabólitos ou na forma nativa. De forma indirecta através de excrementos, e da descarga de fármacos não utilizados ou com o prazo de validade expirado; e de forma directa através de descargas feitas pelas estações de produção farmacêutica (Carvalho, 2012).

Consequentemente, os vários tipos de produtos farmacêuticos entram em contacto com águas superficiais, águas subterrâneas, águas costeiras e até mesmo águas potáveis através dos efluentes descarregados das Estações de Tratamento das Águas Residuais (ETAR). A introdução de águas residuais domésticas tratadas nos recursos hídricos tem aumentado a preocupação em relação à introdução de antibióticos e de bactérias resistentes nas águas potáveis (Halling- Sørensen *et al.*, 1998). Visto que, actualmente, as águas residuais urbanas são consideradas a maior e mais importante fonte de compostos farmacêuticos no meio ambiente.

Posto isto, é de extrema importância tratar estas águas antes de serem excretadas para o meio ambiente.

As ETAR foram criadas para remover poluentes orgânicos, principalmente matéria orgânica dissolvida, sólidos e nutrientes (Gagnon *et al.*, 2014). Para a maioria dos fármacos, as suas remoções através de métodos de tratamento biológicos convencionais mostram-se ineficiente, sendo estes compostos encontrados em quantidades significativas nos efluentes das ETAR e das águas superficiais que recebem estes efluentes. A exposição de organismos aquáticos aos produtos farmacêuticos e aos seus metabólitos pode ser significativa, tendo em conta os níveis consideráveis encontrados nos efluentes tratados das ETAR (Carvalho, 2012).

Descargas directas de indústrias pecuárias efluentes no meio aquático (drenar directamente para rios e lagos) são uma fonte significativa destes compostos no meio ambiente (Tong *et al.* 2009). Os produtos farmacêuticos presentes nas águas residuais de matadouros que são descarregados directamente para um rio mais próximo, após a eliminação simples, podendo influenciar significativamente o meio ambiente local (Shao *et al.* 2009).

Em semelhança às ETAR municipais, a maioria dos tratamentos de águas residuais também não são concebidos para remover compostos farmacêuticos. Embora alguns destes efluentes sejam dirigidos para ETAR municipais, a maioria deles são directamente descarregados no meio ambiente.

Tendo isto em consideração, torna-se necessário aumentar o conhecimento sobre o destino dos produtos farmacêuticos durante o tratamento destas águas residuais (Fent *et al.*, 2006). No entanto, apenas alguns trabalhos recentes foram dedicados ao monitoramento de fármacos nesse tipo de efluentes (Ben *et al.* 2008; Shao *et al.* 2009).

Têm sido desenvolvidas algumas tecnologias mais avançadas, tais como processos de oxidação (ozonização, fotólise e fotólise heterogénea, entre outros), adsorção por carvão activado e bioreactores de membrana para aumentar a eficiência de remoção de produtos farmacêuticos (Sirés e Brillas, 2012). No entanto, estes sistemas requerem um nível elevado de consumo de energia, e a sua construção e manutenção fica dispendiosa. Um sistema alternativo, que é viável e económico, é a utilização de leitos de macrófitas (ZHC), pelo facto de apresentar um baixo custo de construção, operação e de manutenção (Carvalho, 2012; Dordio *et al.*, 2010; Matamoros e Salvadó, 2012).

Tendo tudo isto em conta, nas últimas décadas tem sido demonstrado através de diferentes estudos elaborados, que os leitos de macrófitas são eficazes no tratamento e remoção de poluentes em vários tipos de águas residuais; tais como águas residuais domésticas, águas residuais agrícolas e águas residuais industriais.

O uso de ZHC ainda é um tratamento relativamente recente para a remoção de fármacos veterinários. Exigindo uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos, a sua eficiência na remoção de fármacos, a influência que o *design* pode ter; assim como, os factores ambientais e os possíveis riscos de toxicidade a eles associados (Li *et al.*, 2014).

1.5 Zonas Húmidas Construídas (ZHC)

Tem vindo a aumentar a preocupação em relação à poluição provocada pelos fármacos, após ter sido confirmada a sua presença e a capacidade de pseudo-persistir no meio ambiente, como por exemplo nos recursos aquáticos (Carvalho *et al.*, 2013).

O uso desmedido de algumas drogas e o facto da sua remoção por parte das ETAR convencionais ser ineficiente, acabam por ser as principais razões por ocorrerem frequentemente produtos farmacêuticos em organismos aquáticos (Carvalho *et al.*, 2013). A remoção destes compostos é ineficiente em águas residuais, pois as estações de tratamento não se encontram preparadas para degradar este tipo de compostos (López-Peñalver *et al.*, 2010; Pruden *et al.*, 2006).

Existe uma necessidade crítica de seleccionar uma tecnologia de tratamento que seja altamente eficiente, e que tenha um custo razoável de operação, de forma a remover resíduos de antibióticos de águas residuais de suiniculturas (Liu *et al.*, 2013).



Figura 1 – Exemplo de uma Zona Húmida Construída usada para o tratamento de águas residuais (imagem adaptada, disponível em: <<https://www.biomatrix.com>>, acesso em Ago. 2016).

Surgiu assim uma opção mais viável e rentável, em que é possível obter efluentes de alta qualidade utilizando menos energia (Dordio *et al.*, 2010; Helt *et al.*, 2012), através da construção de ZHC, ou seja, a recriação de um ecossistema natural de uma zona húmida capaz de remover poluentes que as ETAR convencionais não são capazes. A das desvantagens é o fato de ser necessária uma área grande para o seu uso (Matamoras and Salvadó, 2012).

ZHC são sistemas de tratamento de águas residuais baseados no funcionamento de zonas húmidas naturais (Figura 1), que tem sido desenhados e construídos para serem utilizados no tratamento destas mesmas águas na remoção de poluentes (Li *et al.*, 2014; Vymazal, 2011), podendo ser usados como método complementar aos tratamentos mais convencionais (Zhang *et al.*, 2014).

Estes sistemas de tratamento promovem diferentes “microambientes” onde podem ocorrer variados processos de remoção, tais como: físicos (retenção, adsorção ao substrato, adsorção ao biofilme, fotodegradação e volatilização), químicos (degradação, etc.), vegetais (fito-volatilização, bombeamento de oxigénio para a rizosfera) ou microbiológicos (metabolização) (Carvalho *et al.*, 2013).

As ZHC são caracterizadas pelo uso de processos naturais com três aspectos que se destacam – vegetação natural (macrófitas), o solo e a população microbiana associada, para auxiliar no tratamento de águas residuais ou de outras águas poluídas. E para que o seu funcionamento seja o melhor possível está dependente da interacção entre as plantas, substrato e microrganismos (ITRC, 2003; Leto *et al.*, 2013).

Como resultado das condições saturadas provocadas pelo contacto com estas águas contaminadas, o solo de uma zona húmida desenvolve características únicas tendo um tipo de vegetação adaptado a viver em condições extremas (ITRC, 2003).

A escolha das plantas a utilizar tem bastante importância para que uma ZHC tenha sucesso, tendo em conta que estas são mediadoras do processo. Sendo necessário ter em conta diferentes factores como é o caso das condições climáticas, o habitat e a composição da água residual a ser tratada (Calheiros *et al.*, 2007; Leto *et al.*, 2013).

As macrófitas são as plantas comumente utilizadas, e existem diversas espécies que podem ser usadas para esta prática. Uma das mais frequentemente utilizadas é a espécie *P. australis* pelo facto de apresentarem uma grande capacidade de tolerância a fármacos presentes em águas contaminada, e por ter a capacidade de os remover (Ávila *et al.* 2010; Botequilha, 2013; Matamoros e Bayona 2006).

De acordo com a literatura, as ZHC podem ser classificadas de acordo com a sua hidrologia e o tipo de escoamento. Podendo ser de escoamento superficial ou subsuperficial, em que a última se subdivide em escoamento horizontal ou vertical (Zhang *et al.*, 2012).

Nas ZHC de escoamento superficial (Figura 2) a água residual desloca-se na horizontal num tanque pouco profundo (0,3-1m) com declives de leito entre 0,5-1,5%, sendo impermeabilizada no fundo. Este tipo de escoamento é mais adequado para climas quentes, isto porque as taxas de decomposição biológica diminuem com as baixas temperaturas (Botequilha, 2013).

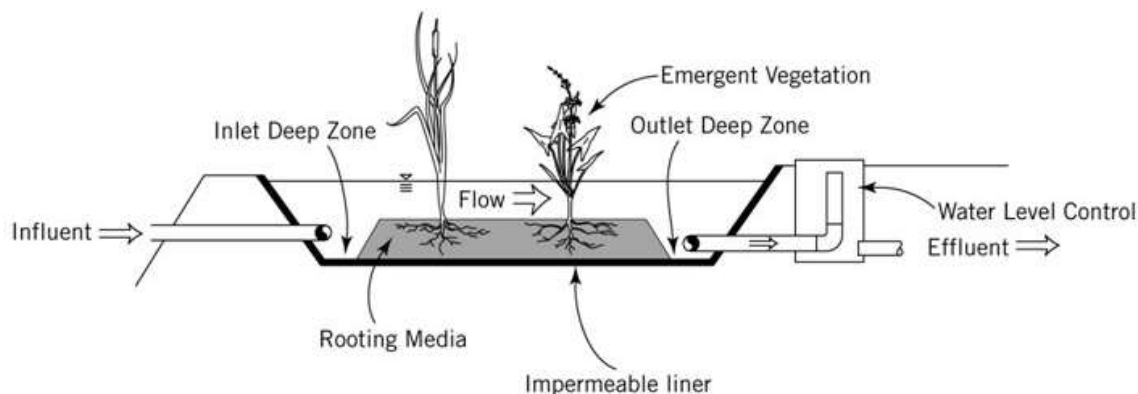


Figura 2 – Representação esquemática do escoamento superficial. (disponível em: <http://slideplayer.com/slide/4629078/>, Ago. 2016)

Nas ZHC de escoamento subsuperficial a água residual desloca-se pelo substrato, tendo como principal vantagem a menor presença de odores, visto que a água residual se mantém na zona do substrato.

As ZHC de escoamento subsuperficial podem ser divididas consoante a direcção da alimentação:

- i) Escoamento Subsuperficial Horizontal (Figura 3): na base da ZHC existe uma membrana de substrato impermeável, podendo ser de gravilha ou outro material, onde posteriormente será plantado um conjunto de macrófitas (ex. *P. australis*). O efluente irá ser distribuído na parte inicial do leito, ao longo de toda a sua extensão e altura deslizando ao longo do substrato e rizosfera entrando em contacto com zonas aeróbicas e anaeróbicas. Através desta técnica irão ocorrer diferentes mecanismos, tais como, adsorção, absorção, precipitação e degradação microbiana (Botequilha, 2013).

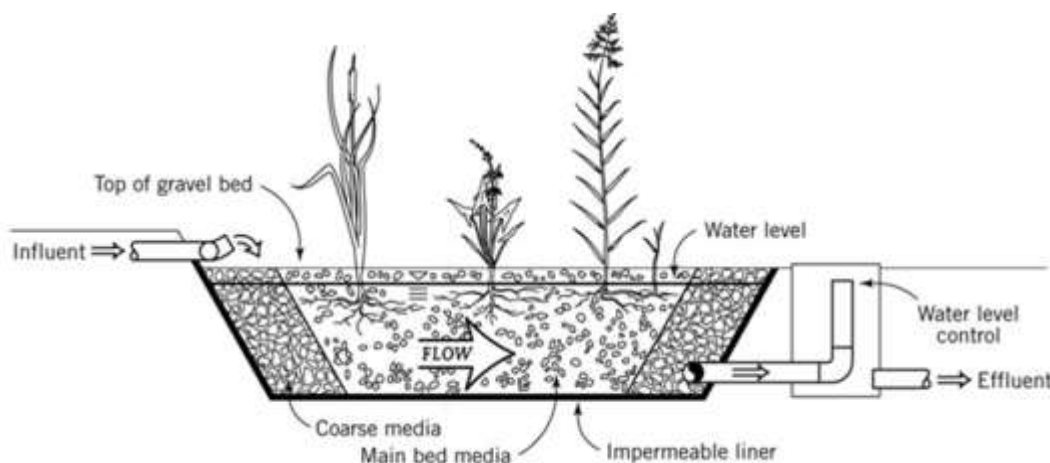


Figura 3 – Representação esquemática do escoamento subsuperficial horizontal. (disponível em: <http://slideplayer.com/slide/4629078/>, Ago. 2016)

- ii) Escoamento Subsuperficial Vertical (Figura 4): o efluente desloca-se na vertical e gradualmente através de um substrato com camadas de diferentes espessuras e porosidades. Este tipo de escoamento pode ainda ser subdividido em descendente ou ascendente. Um escoamento vertical descendente é constituído por uma base com substrato em gravilha, em que o tamanho vai aumentando à medida que desce. Num escoamento vertical ascendente, o efluente desloca-se de forma inversa, de baixo para cima, sendo recolhido à superfície do leito (Vymazal e Kröpfelová, 2008).

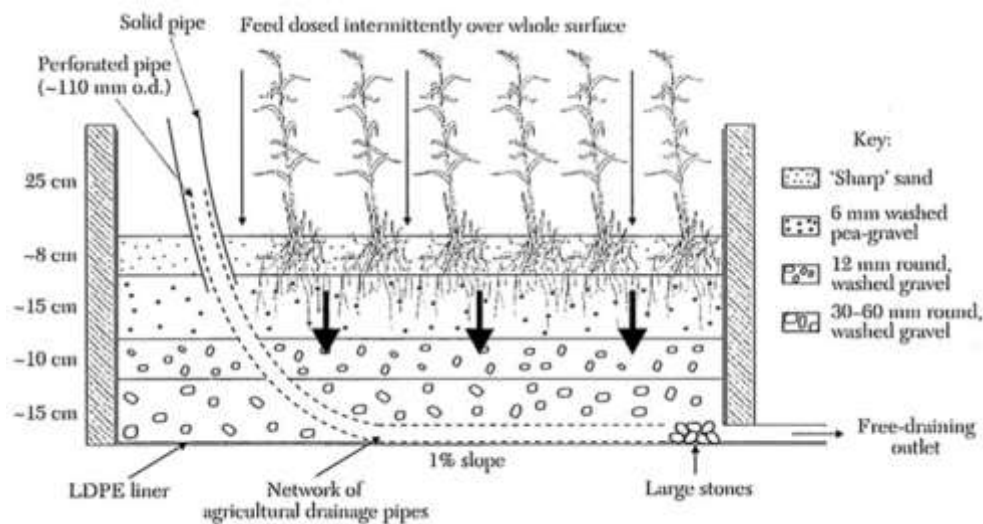


Figura 4 – Representação esquemática do escoamento subsuperficial vertical. (disponível em: <http://slideplayer.com/slide/4629078/>, Ago. 2016)

Actualmente existe pouca informação disponível sobre o tratamento de suiniculturas através das ZHC (Liu *et al.* 2013). Posto isto, já é possível encontrar diversos estudos que provam a eficiência das ZHC na remoção de fármacos de uso humano bem como para o uso veterinário em águas residuais (Carvalho, 2012).

1.6 Objectivos

Esta dissertação teve como objectivo avaliar o potencial das ZHC simuladas para a remoção de bactérias resistentes a antibióticos em efluentes de suinicultura. Devido à falta de informação sobre a resistência a antibióticos veterinários e à fitorremediação destes produtos é necessário elaborar mais estudos sobre este tema. Apesar de já existirem estudos sobre resistência a antibióticos, estes focam-se mais nos de uso humano. Com a falta de informação acerca destes fármacos, e por ainda não se encontrarem legislados, a concentração máxima permitida por lei em sistemas aquáticos ainda não se encontra determinada. Sendo o sistema mais estudado o das ETAR tanto para águas residuais urbanas, como de centros hospitalares, é perceptível a existência de uma lacuna relativamente a águas de produção animal. Posto isto, o tema desta dissertação mostra ser importante e relevante para a comunidade científica, e poderá contribuir para o avanço do conhecimento na área.

Capítulo 2

Métodos

2. Métodos

2.1 Amostragem

Para este estudo, foram recolhidas plantas da espécie *Phragmites australis* nas margens do Rio Lima (Figura 5) em maio de 2014, ainda com o sedimento a envolver as raízes, de forma a preservar os microrganismos presentes na rizosfera. Recolheu-se também areia (40 Kg) do mesmo local para tentar preservar ao máximo as características do meio envolvente. Já no laboratório, foi retirado o sedimento que envolve as raízes, de forma a adquirir a maior quantidade de sedimento possível, e reservou-se para posteriormente ser utilizado. O sedimento foi misturado homogeneamente com a areia numa proporção de 1:2, tornando assim o solo mais poroso (para tentar reduzir possíveis colmatações do sistema). As raízes das plantas foram lavadas com água desionizada para retirar sedimento em excesso, sendo as plantas replantadas posteriormente nos microcosmos montados (ver abaixo).



Figura 5 – Margens do estuário do rio Lima..

2.2 Configuração dos microcosmos

O sistema de microcosmos foi montado de acordo com estudos previamente elaborados (Carvalho, 2012) para simular uma Zona Húmida Natural.

Foram montados doze microcosmos usando tanques de plástico (0,4 m x 0,3m x 0,3m), e preenchidos com três camadas de substrato (Figure 6): a primeira camada contendo cascalho (com 4 cm de profundidade), a segunda camada com *lava rock* (com 2 cm de profundidade), e por fim, foi completado com a mistura de sedimento e areia (10 cm de profundidade); tendo um total de 16 cm. Na base do tanque foi aplicada uma torneira, para se efectuar o escoamento do efluente; e por fim foi plantado com cerca de 80 plantas por tanque.

De forma a melhor simular um sistema real, todos os microcosmos foram revestidos com papel de alumínio de forma a impedir a penetração da luz solar no substrato. Com isto, pretende-se assegurar que a degradação dos compostos seja resultante da actividade bacteriana e não da foto-degradação. Todos os sistemas foram mantidos num ambiente interno controlado, estando sujeitos a variações de temperatura e à exposição solar natural (ciclo dia/noite). Estes 12 sistemas foram divididos em 4 conjuntos (controlo, enrofloxacina, ceftiofur e misturas) cada um com três réplicas.



Figura 6 – Montagem dos sistemas de microcosmos (Imagens adaptadas de Carvalho, 2012).

2.3 Funcionamento dos microcosmos e recolha de amostras

Após a montagem dos microcosmos, durante os 10 primeiros dias, os microcosmos foram deixados a aclimatar às novas condições. Durante este período foi adicionado 1,5 L de uma solução de nutrientes modificada (Hoagland and Arnon, 1950) a cada microcosmos, sendo a solução repostada diariamente, para manter as plantas em ótimas condições nutricionais e terem uma boa aclimatização ao novo sistema. A solução foi retirada e renovada todos os dias. O nível da água foi sempre mantido ligeiramente acima da superfície, correspondendo a uma taxa de 100% de inundação. Na semana seguinte foi introduzida a água residual recolhida na suinicultura deixando os sistemas novamente a aclimatar durante uma semana, recirculando a mesma água diariamente para impedir o desenvolvimento de zonas de anoxia.

A suinicultura possuía um sistema físico para a separação de sólidos presentes nas águas residuais, e ainda um sistema de lagoas aeróbias com arejamento para a decomposição significativa da matéria orgânica, sendo a água residual utilizada a recolhida após estes dois tratamentos. De seguida, procedeu-se à adição de 1,2 L de água residual proveniente da suinicultura dopada ou não (controlo). As concentrações finais de cada fármaco na água residual dopada foram de 100 µg/L.

O tempo de duração escolhido para cada ciclo foi de uma semana, simulando os tempos de retenção hidráulica normalmente utilizados em sistemas de ZHC. A concentração dos fármacos veterinários seleccionados para esta experiência, apesar de ser um pouco elevada já foi detectada em águas deste tipo (Carvalho, 2012).

O estudo foi feito em triplicado, sendo que três microcosmos foram dopados com 100 µg/L de enrofloxacin (ENR), outros três com 100 µg/L de ceftiofur (CEF); e por fim três microcosmos foram dopados 100 µg/L de ambos os fármacos denominado mistura (MIX, 200 µg/L) (Figura 7 e 8). Para o ultimo conjunto de três microcosmos a água residual não foi dopada com nenhum dos fármacos utilizados, servindo de sistema controlo.

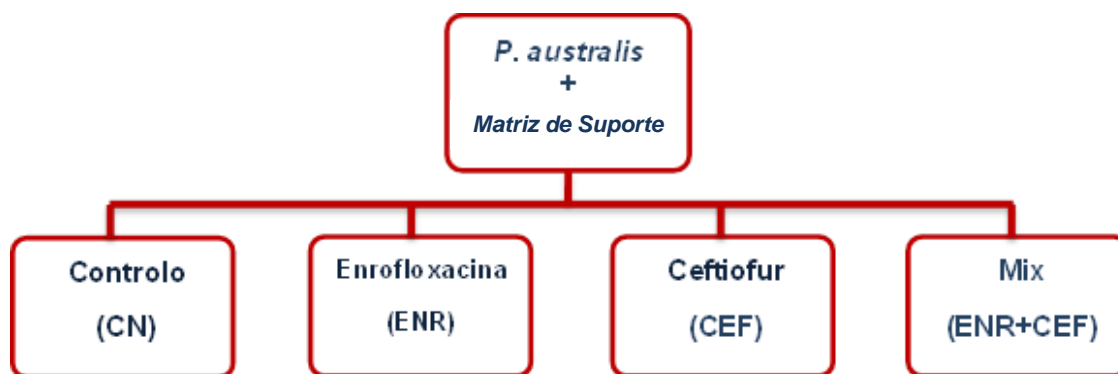


Figura 7 – Diagrama de montagem dos microcosmos.

A cada semana, os microcosmos foram completamente drenados e reabastecidos com nova água residual da suinicultura dopada ou não. Durante todos os dias (com excepção do Domingo pela faculdade estar encerrada) a água foi recirculada para se tentar evitar a formação de zonas anóxicas na matriz de suporte. Para controlar o problema da evaporação da água que ocorria diariamente, aquando da recirculação perfazia-se o volume que faltava nos microcosmos com água desionizada até atingir o valor inicial. A partir da 6ª semana apenas 1 L de água residual, dopada ou não, foi adicionada aos microcosmos porque os sistemas estavam a entrar em saturação. No final de cada semana a água foi removida de cada microcosmo, introduzindo-se novamente água residual nova, dopada ou não. O estudo teve a duração de 20 semanas, em que a recolha de amostras das águas para análise foi à semana 1, 2, 4, 8, 14, 18 e 20. Estas soluções foram filtradas (membrana de nitrato de celulose, 0,45 µm de porosidade), sendo as membranas utilizadas de imediato para a sua caracterização microbiológica.



Figura 8 – Disposição dos microcosmos em triplicado, de acordo com o diagrama apresentado (Imagem de Autor).

2.4 Caracterização Microbiológica por Cultura em Placa

A técnica usada para a caracterização microbiana nesta dissertação foi o método de filtração por membrana, descrito anteriormente por *Novo e Manaia (2010)* e *Ferreira da Silva et al. 2006*. Foram contabilizadas colônias de bactérias Heterotróficas, Coliformes e Enterococos, respectivamente, em meios de cultura Plate Count Agar (Liofilchem®), *m*-FC Agar (Liofilchem®) e Slanetz Bartley Agar + TTC (Liofilchem®). As populações resistentes a antibióticos foram enumeradas no meio correspondente, com concentrações de 400 µg/L tanto para CEF como para ENR (Figura 9).

As concentrações usadas foram determinadas em estudos prévios, como adequadas para a recuperação de bactérias resistentes a antibióticos (*Watkinson et al. 2007*), e as bactérias que crescem nos meios de cultura são resistentes aos respectivos antibióticos.

Usando membranas de nitrato de celulose, com 0,45 µm de porosidade, foram filtrados volumes entre 1 – 100 ml de amostra e/ou as suas sucessivas diluições adequadas. Cada membrana foi colocada nos meios de cultura previamente preparados, e incubadas a 30 °C durante 24h (bactérias Heterotróficas), 37 °C durante 24h (Coliformes) e 37 °C durante 48h (Enterococos). As amostras foram filtradas com diferentes concentrações para que fosse possível contabilizar a densidade das unidades formadoras de colônias (UFC).

Terminado o período de incubação, o número de colônias crescidas em cada membrana foi contabilizado e registado, sempre que possível em placas que apresentavam entre 10 e 80 colônias. Os valores registados em cada meio de cultura, contendo ou não antibiótico, foram posteriormente utilizados para a elaboração da análise do tratamento de dados.

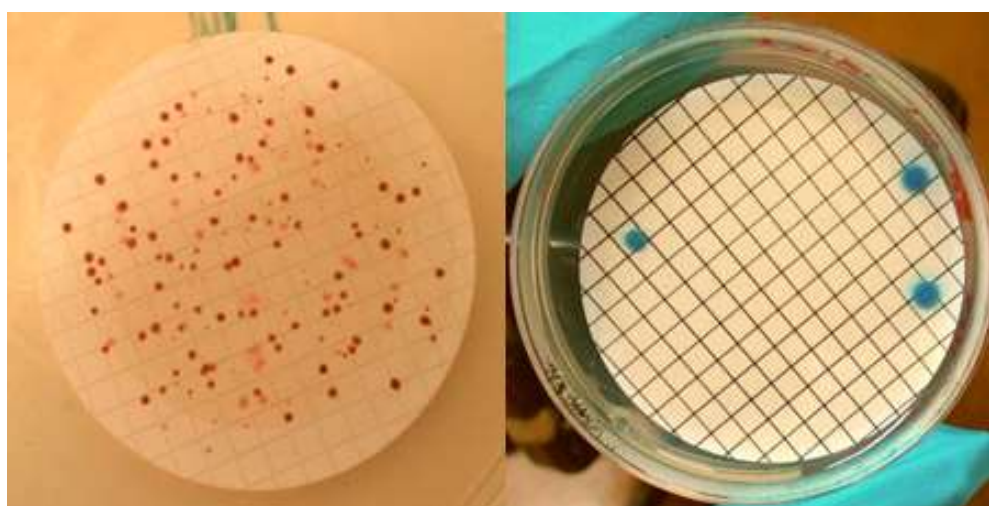


Figura 9 – Exemplo de meios de cultura para bactérias Enterococos.

2.5 Isolamento Microbiano

Tendo em conta o elevado número de colónias, e as diferenças apresentadas pelas mesmas, foi feito um isolamento microbiano através de riscados em placas.

Dado já não existir amostras da água inicial para plaqueamentos, tentou-se recuperar a comunidade microbiana a partir de filtros crescidos em PCA do efluente inicial da última semana de amostragem (S19).

Para tal, usando meios de cultura de PCA novos, colocaram-se os filtros com as colónias virados para baixo. Isto serviu para que as colónias se transferissem para o meio.

Com 1 mL de solução salina a 0,85% procedeu-se à lavagem das placas, conseguindo-se recolher as comunidades presentes em cada filtro.

Dilui-se a cultura até à diluição 10^{-8} , e voltou-se a efectuar riscados para diluições sucessivas de 10^{-2} a 10^{-8} em meios de PCA, PCA+ENR, PCA+CEF e PCA+MIX. Foi a incubar durante 24h a temperaturas ideais. Terminado o período de incubação, procedeu-se ao isolamento das diferentes colónias (Figura 10), repicando-se cada colónia para as placas correspondentes aos espalhamentos. Realizam-se mais riscados até se obterem colónias isoladas e purificadas. Para finalizar recolhe-se a maior quantidade de colónias para um *ependorf*, devidamente esterilizado, e armazena-se a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior. Volta-se a repetir o processo para a água recolhida de cada sistema, alterando-se os valores das diluições para 10^{-5} para a cultura-mãe, e de 10^{-1} a 10^{-5} , para as diluições a serem plaqueadas.

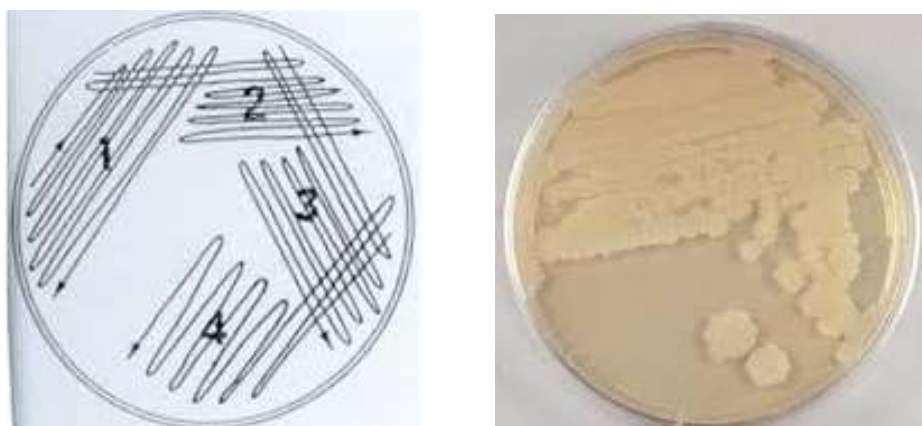


Figura 10 – Riscados em meio de cultura de PCA (disponível em: <[https:// www.esac.pt](https://www.esac.pt)>, acesso em Ago. 2016)

2.6 Análise de Dados

Após o cálculo dos desvios padrão de todas as amostras recolhidas ao longo das 20 semanas, estimou-se a percentagem de resistência para cada antibiótico no efluente bruto e tratado para cada amostra recolhida.

Utilizando a seguinte equação (Novo e Manaia, 2010):

$$\% \text{ Resistência} = \frac{(\text{UFC/mL}) \text{ média com antibiótico}}{(\text{UFC/mL}) \text{ média sem antibiótico}} \times 100$$

A eficiência de remoção de BRA foi estimada para cada grupo bacteriano (Heterotróficos, Coliformes e Enterococos) através do rácio entre as colónias observados, respectivamente, em PCA, *m*-FC ou Slanetz Agar; nos efluentes bruto e tratado.

Utilizando da seguinte equação (Novo e Manaia, 2010):

$$\% \text{ Remoção} = \left(1 - \frac{(\text{UFC/mL}) \text{ efluente tratado}}{(\text{UFC/mL}) \text{ efluente inicial}} \right) \times 100$$

Capítulo 3

Resultados

3. Resultados

3.1 Efluente Inicial

1. Composição do Efluente

Como foi dito anteriormente, esta dissertação tem como objectivo tentar perceber o potencial das Zonas Húmidas Construídas (ZHC), para a remoção da contaminação microbiológica de efluentes de suinicultura, com principal ênfase na remoção de bactérias resistentes a antibióticos. Este trabalho encontra-se incluído num projecto mais vasto no qual foram obtidos os parâmetros de caracterização geral do efluente inicial, colhido ao longo da experiência (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores obtidos para os diferentes parâmetros analisados no Efluente Inicial (adaptado de Ferreira, 2014).

Parâmetros	Valores
pH	7,68 - 7,91
COD	1416 - 1649 mgO ₂ /L
BOD	207 - 516 mgO ₂ /L
Sólidos Totais	3,3 g/L
Sólidos Suspensos Voláteis	1,3 g/L
Sólidos Suspensos Totais	1,5 g/L
Amónia (NH ₃)	27 - 70 mM
Nitratos (NO ₃ ⁻)	1,1 - 313,3 µM
Nitritos (NO ₂ ⁻)	3,4 - 9,9 µM
Fosfatos (PO ₄ ³⁻)	131 - 908 µM
Cobre (Cu)	0,26 - 2,20 mg/L
Zinco (Zn)	0,59 - 3,14 mg/L
Manganês (Mn)	0,24 - 0,41 mg/L
Ferro (Fe)	0,39 - 5,09 mg/L

3.1.1 Densidade Microbiana

As Unidades Formadoras de Colónias (UFC/ml) são a unidade utilizada para estimar o número de bactérias viáveis numa amostra. A viabilidade é definida como a capacidade de se multiplicarem sob condições controladas, formando colónias.

Após o tratamento dos dados para o número de colónias obtidas no efluente inicial, obtiveram-se os valores em unidades de \log_{10} UFC/100ml para os diferentes grupos bacteriológicos (bactérias Heterotróficas, Coliformes e Enterococos), cultivados na ausência (totais) e na presença de antibióticos com uma concentração de 100 $\mu\text{g/L}$ (Enr, Cef e Mix), ao longo das várias semanas de tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Contagem de UFC presentes no efluente inicial para cada microcosmos ao longo das semanas (S) de tratamento, para os diferentes grupos de bactérias (Heterotróficas, Coliformes e Enterococos) cultivadas na ausência (totais) e na presença dos diferentes antibióticos com uma concentração de 100 $\mu\text{g/L}$ (Enr, Cef e Mix), expressos em \log_{10} de UFC/100ml.

Log10 UFC/100ml		S0	S1	S3	S7	S13	S17	S19
Heterotróficas	Totais	7.11	7.86	8.70	8.68	7.75	10.70	10.63
	Enr	4.08	3.95	5.18	4.88	4.36	5.30	4.83
	Cef	6.15	6.08	6.70	6.49	5.97	6.56	6.38
	Mix	4.00	3.00	3.28	3.72	4.04	5.27	4.48
Coliformes	Totais	4.73	4.61	3.85	5.26	5.34	4.56	4.99
	Enr	3.40	3.30	2.78	3.34	3.32	3.57	4.43
	Cef	3.82	3.61	2.00	3.64	3.92	3.52	3.85
	Mix	2.30	2.38	2.48	3.00	2.86	2.48	3.00
Enterococcus	Totais	4.15	4.36	3.99	4.51	4.52	4.08	4.53
	Enr	3.65	3.53	3.56	3.51	3.53	3.21	3.72
	Cef	3.18	3.00	3.08	3.74	4.04	2.98	3.48
	Mix	2.60	2.90	2.85	2.41	2.79	2.00	2.70

Os diferentes grupos de bactérias (Heterotróficas, Coliformes, Enterococos), presumivelmente resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), apresentam valores de densidade inferiores aos cultivados na ausência dos antibióticos (totais). No decorrer das

semanas de tratamento, pode observar-se uma variação para todos os grupos de bactérias no número de colónias formadas (Figura 11).

Para as bactérias Heterotróficas, é possível observar que se trata das bactérias com mais colónias formadas, com maior número na ausência de antibiótico (totais) como seria de esperar, e que apresentam uma certa tendência para aumento ao longo do tempo. Entre as bactérias resistentes a antibiótico, destacam-se as resistentes a Cef como as mais abundantes. As bactérias Coliformes e as Enterococos apresentam um comportamento similar ao das bactérias Heterotróficas, ou seja, na ausência de antibiótico formam-se mais colónias do que na sua presença. Em termos de bactérias totais os valores são similares para Coliformes e Enterococos, e no caso das bactérias resistentes a antibióticos observa-se um padrão geral de abundância similar para as resistentes a Enr e Cef.

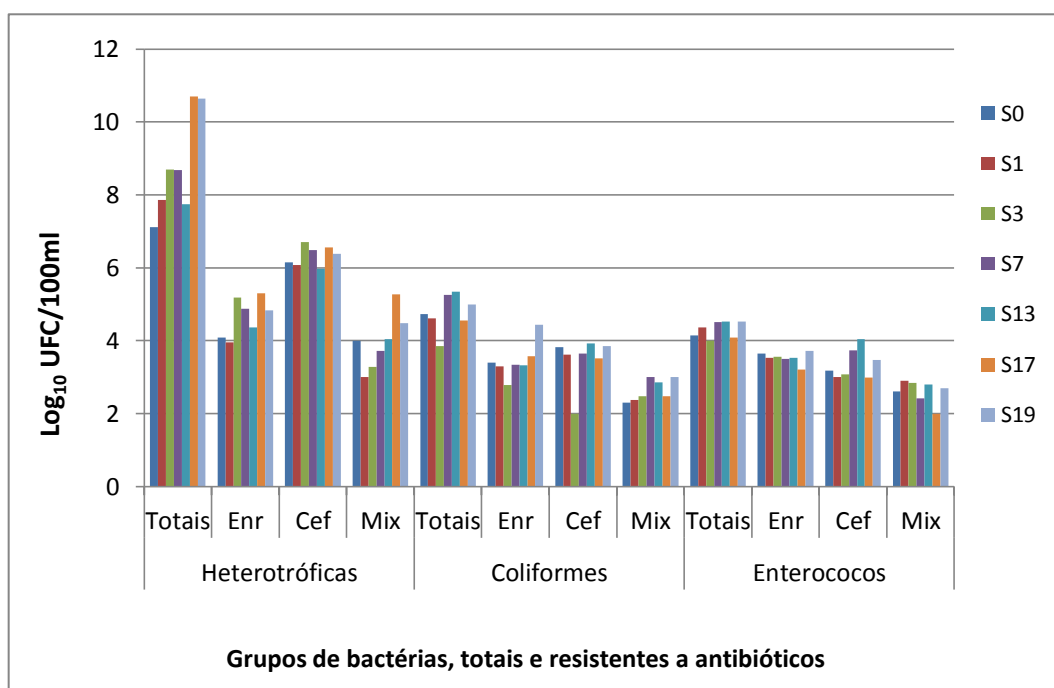


Figura 11 – Abundância de bactérias Heterotróficas, Coliformes e Enterococos, totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), no efluente inicial das diferentes semanas de tratamentos (S0 – S19).

3.1.2 Percentagem de Resistência a Antibióticos

A percentagem de resistência a cada antibiótico foi calculada através da razão entre o número médio de colónias crescidas na presença e na ausência desse antibiótico.

Tendo em conta a distribuição dos grupos bacterianos (Figura 12), é visível que as bactérias Heterotróficas são o grupo que apresenta menor resistência aos diferentes antibióticos. Por outro lado as Enterococos são o grupo que apresenta maior resistência aos vários antibióticos, a qual vai diminuindo ao longo das semanas de tratamento (Figura 12).

O grupo de bactérias Heterotróficas apresentam maior resistência ao ceftiofur, destacando a semana 1 com valor de 11%, voltando a decrescer até ao final do tratamento. Para o grupo das Coliformes, as bactérias apresentam resistência aos diferentes tratamentos, com destaque para a enrofloxacina na semana 19 com 28%. No grupo das Enterococos, observa-se uma maior resistência a todos os antibióticos destacando-se a enrofloxacina com 32 e 37% para a semana inicial e a semana 3, respectivamente. O ceftiofur com 33% para a semana 13; e o Mix de antibióticos com 7% na semana 3 do tratamento.

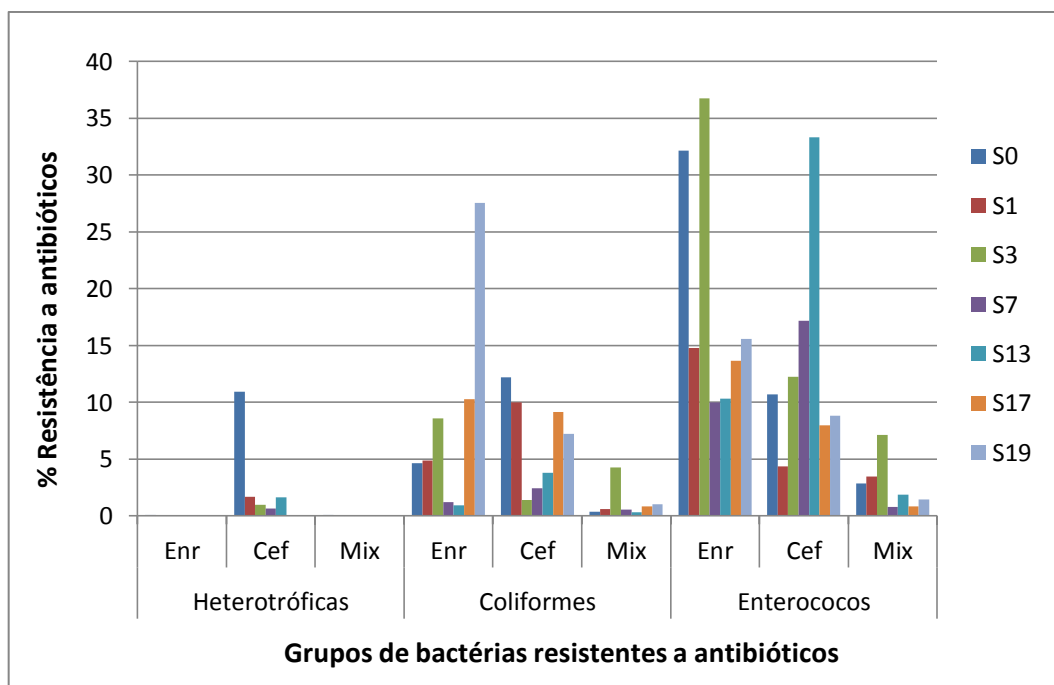


Figura 12 – Percentagem de resistência a antibióticos dos diferentes grupos de bactérias (Heterotróficas, Coliformes e Enterococcus), resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) presentes no efluente inicial, ao longo das semanas de tratamento (S0 – S19).

3.2 Efluente Tratado

O efluente tratado nos diferentes microcosmos, dopado ou não dopado (Control) com Enr, Cef ou a mistura dos dois antibióticos (Mix), foi filtrado para quantificação da abundância dos vários grupos bacteriológicos em estudo.

3.2.1 Heterotróficas

3.2.1.1 Abundância em Unidades formadoras de Colônias (UFC/ml)

Relativamente às bactérias Heterotróficas totais (Figura 13), observa-se uma variação mínima ao longo das semanas, com especial atenção para a semana 14 que se apresenta ligeiramente mais elevada do que as restantes semanas. No geral, os valores mantiveram-se sempre inferiores a $9 \log_{10}$ UFC/100ml.

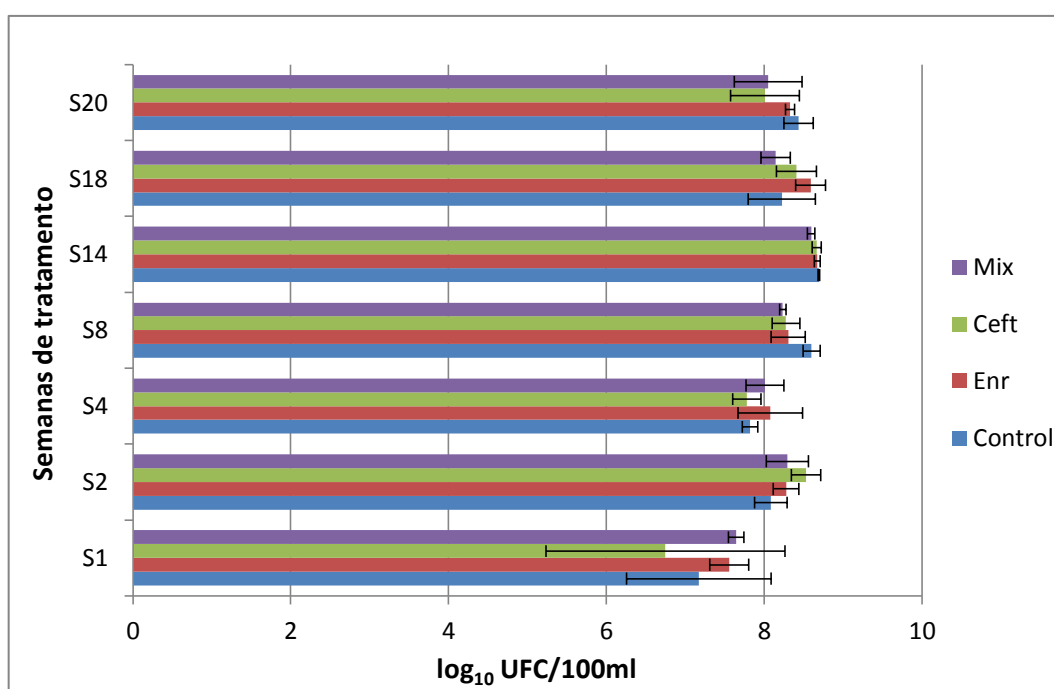


Figura 13 – Abundância de bactérias Heterotróficas totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente às bactérias Heterotróficas resistentes a enrofloxacin (Figura 14), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 1 que apresenta valores inferiores às restantes semanas. Em geral não se observaram diferenças entre os diferentes microcosmos, com excepção da semana 20 onde se observaram valores mais elevados para os sistemas dopados com Enr, sozinha ou em mistura (Mix).

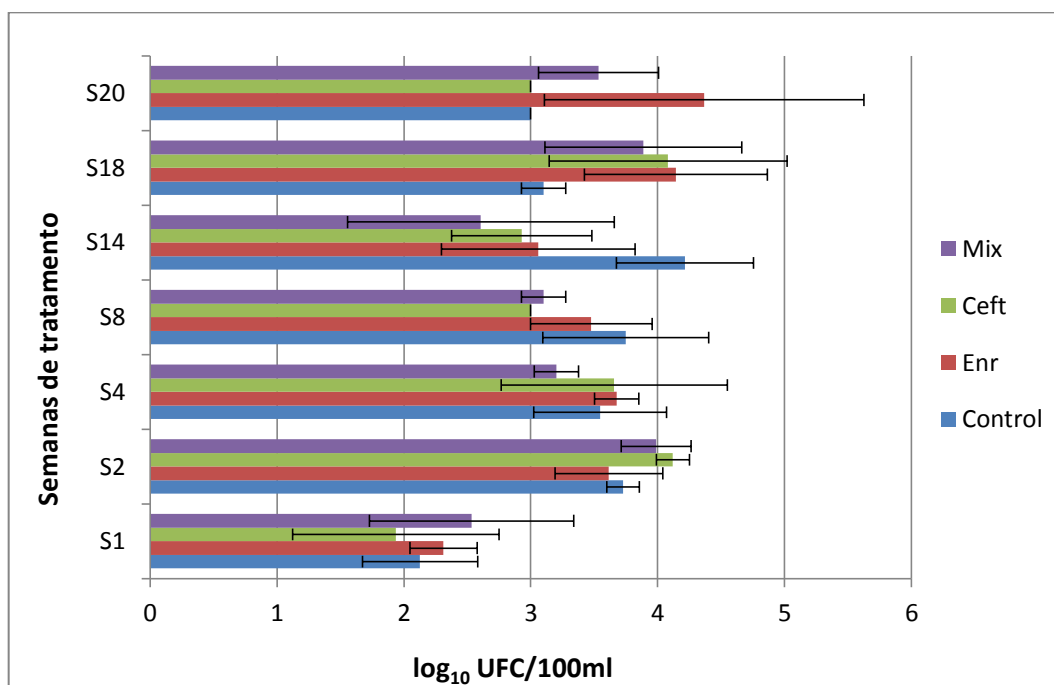


Figura 14 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente às bactérias Heterotróficas resistentes a ceftiofur (Figura 15), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 4 que apresenta valores inferiores às restantes semanas. Em geral não se observaram diferenças entre os diferentes microcosmos, com excepção da semana 20 onde se observaram valores mais elevados para os sistemas dopados com Cef, sozinha ou em mistura (Mix).

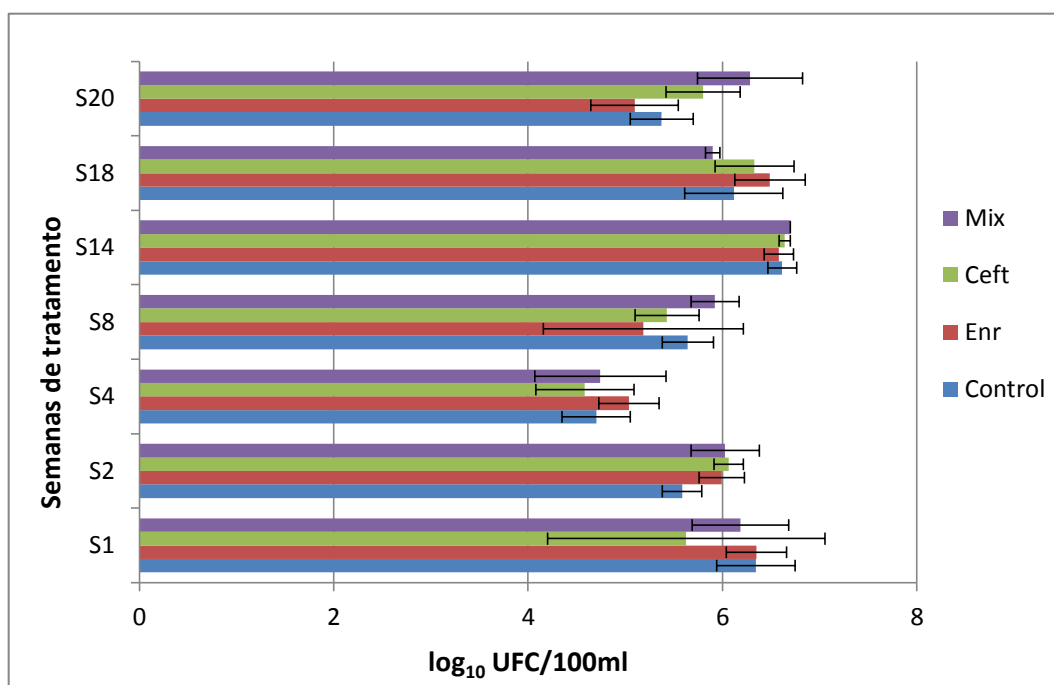


Figura 15 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente às bactérias Heterotróficas resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur (Figura 16), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 2 que apresenta valores superiores às restantes semanas. Em geral não se observaram diferenças entre os diferentes microcosmos.

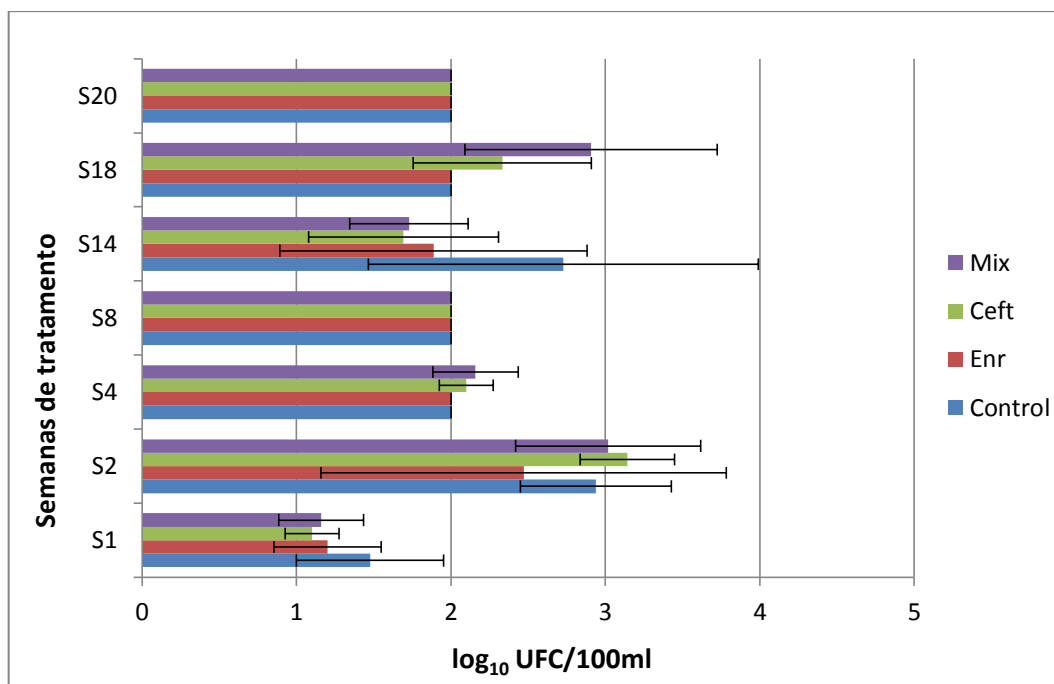


Figura 16 – Abundância de bactérias Heterotróficas resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

3.2.1.2 Percentagem de Resistência a Antibióticos

A percentagem de resistência a cada antibiótico foi calculada através da razão entre o número de colónias crescidas na presença e na ausência desse antibiótico.

Relativamente à percentagem de resistência a enrofloxacin (Figura 17), foram registados valores médios entre 0 e 0,05 %, não se observam diferenças entre tratamentos ou ao longo do tempo. No entanto, na semana 20 observa-se uma tendência para valores mais elevados no microcosmo dopado com Enr.

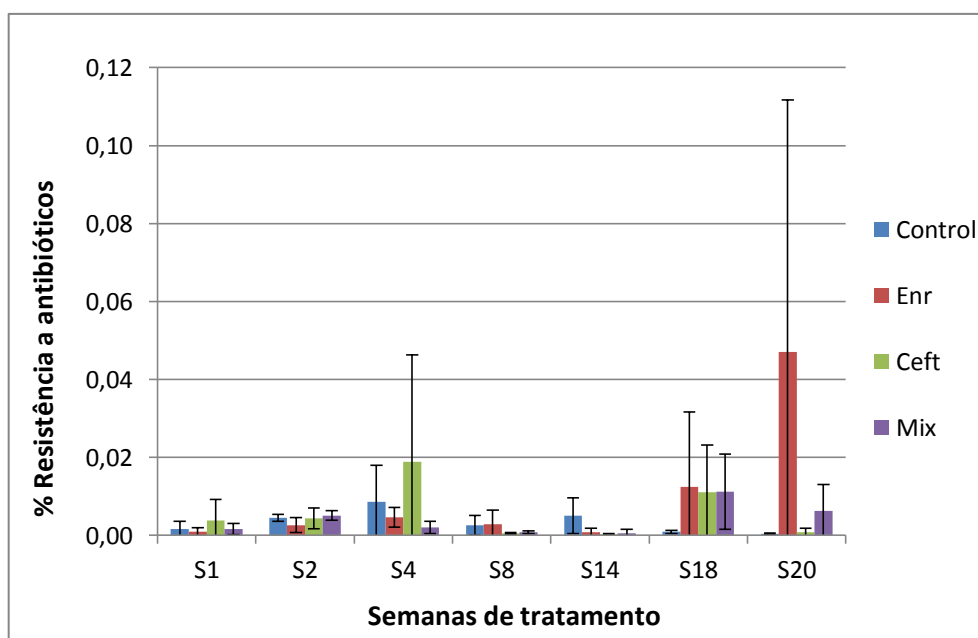


Figura 17 – Percentagem de resistência a enrofloxacin para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência a ceftiofur (Figura 18), os valores variaram entre 0 e 7,98 %, registando-se os valores mais elevados na semana 1, não se observando, em geral, diferenças entre tratamentos. Uma exceção foi a semana 20 onde se observaram valores mais elevados para os microcosmos dopados com Cef, sozinho ou em mistura (Mix).

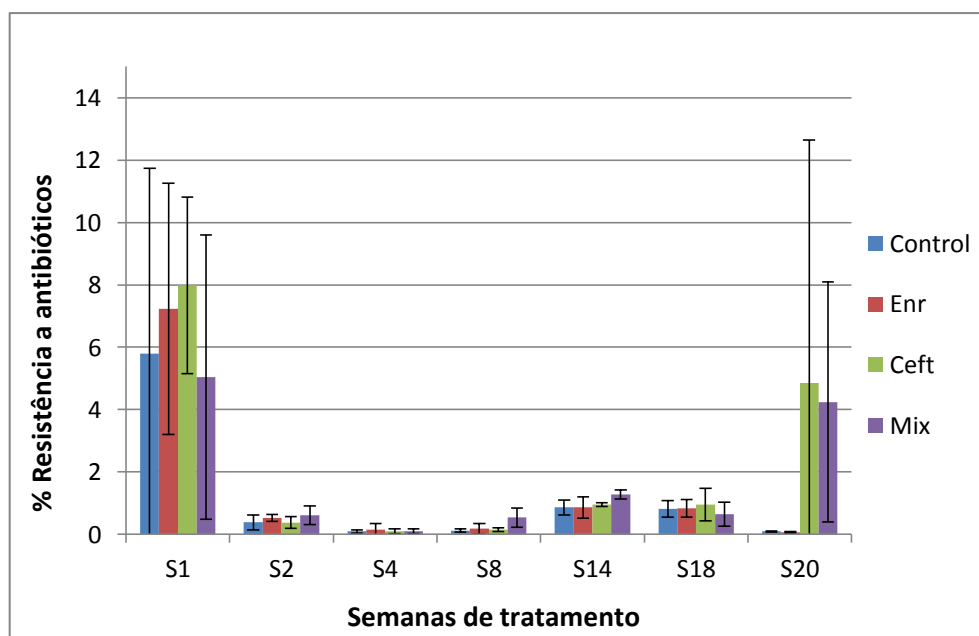


Figura 18 – Percentagem de resistência a ceftiofur para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência à mistura de enrofloxacina e ceftiofur (Figura 19), os valores médios variaram entre 0 e 0,01 %, não se observando diferenças ao longo do tempo.

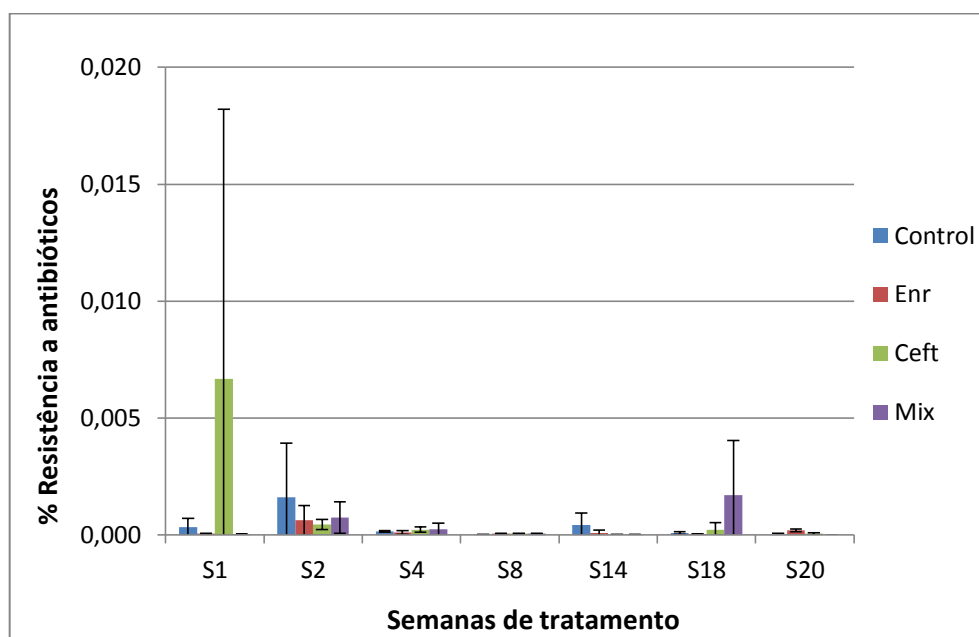


Figura 19 – Percentagem de resistência à mistura de enrofloxacina e ceftiofur para as bactérias Heterotróficas presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

3.2.1.3 *Eficiência de Remoção Bacteriana*

A taxa de remoção de bactérias Heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) foi calculada através dos dados relativos à abundância bacteriana no efluente inicial com os dados do efluente tratado, ao longo das várias semanas de tratamento.

Os valores negativos correspondem a situações em que não houve diminuição mas sim aumento da abundância bacteriana no efluente tratado. Os valores de remoção foram muito variáveis (Tabela 5), apresentando uma tendência para estabilizar nas últimas semana, com valores de remoção superiores a 50 % para as bactérias Heterotróficas resistentes a enrofloxacin e a ceftiofur, e valores de remoção superiores a 99% para as bactérias Heterotróficas totais e para as resistentes à mistura de enrofloxacin e ceftiofur (Mix).

Tabela 3 – Percentagem Eficiência de Remoção (máximo, mínimo e média) de bactérias Heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.

	Heterotróficas											
	Totais			Enr			Cef			Mix		
	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.
S1	-121,09	-248,96	-185,8	98,56	94,36	98,3	-49,05	-101,90	-76,5	99,87	99,57	99,8
S2	-80,56	-400,00	-215,6	39,26	-50,37	8,1	65,83	-12,50	15,8	-35,33	-99,33	-58,8
S4	87,20	67,73	79,8	98,90	88,96	94,0	98,93	97,47	98,3	94,74	91,23	93,4
S8	64,10	15,35	48,0	98,67	87,56	93,5	89,68	69,57	82,6	98,11	98,11	98,1
S14	-604,76	-782,14	-713,8	94,49	-8,41	57,5	-324,37	-437,63	-373,7	99,39	80,15	94,0
S18	99,71	99,18	99,5	99,33	84,17	89,8	77,69	-3,43	34,7	99,95	99,06	99,7
S20	99,70	99,34	99,6	98,51	-36,57	53,5	88,75	-17,36	51,0	99,67	99,67	99,7

3.2.2 Coliformes

3.2.2.1 Abundância em Unidades formadoras de Colônias (UFC/ml)

Relativamente às Coliformes totais (Figura 20), observa-se uma variação ao longo das semanas, com especial atenção para a semana 4 que se apresenta inferior as restantes semanas. No geral, os valores mantiveram-se sempre inferiores a 4 \log_{10} UFC/100ml, não sendo observadas diferenças entre os diferentes microcosmos, com excepção da semana 20 onde se observaram valores mais elevados para o sistema dopado com enrofloxacina (Enr).

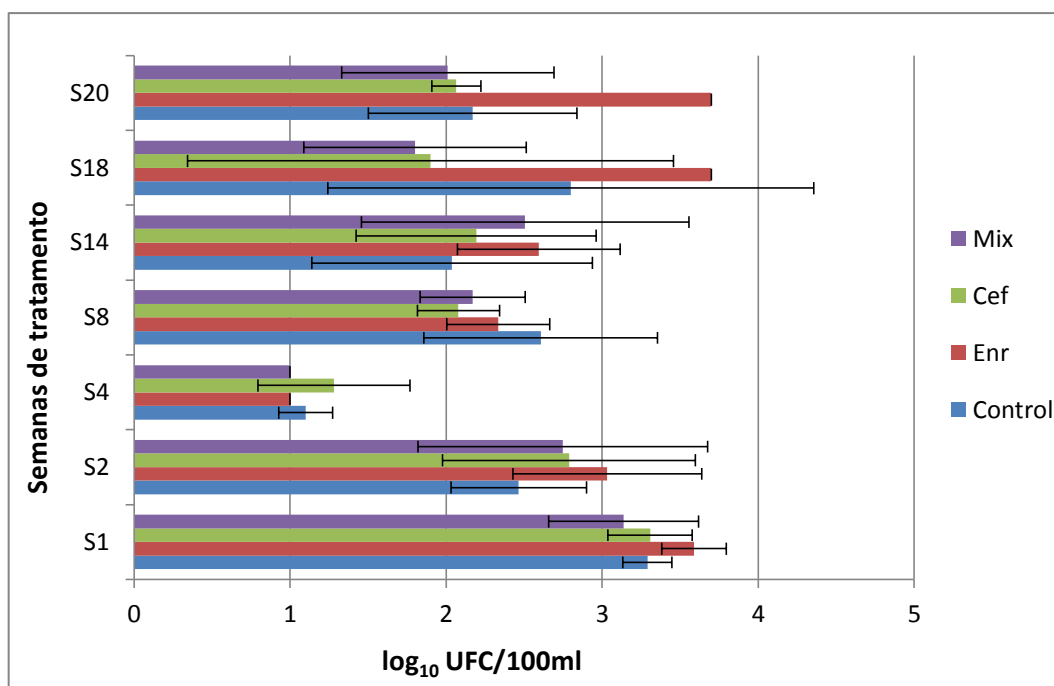


Figura 20 – Abundância de Coliformes totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente às Coliformes resistentes a enrofloxacin (Figura 21), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 18 que apresenta valores superiores às restantes semanas, em que o microcosmo dopado com ceftiofur (Cef) possui o valor mais elevado com 2,65 \log_{10} UFC/100ml; seguido do sistema dopado com enrofloxacin com 2,63 \log_{10} UFC/100ml.

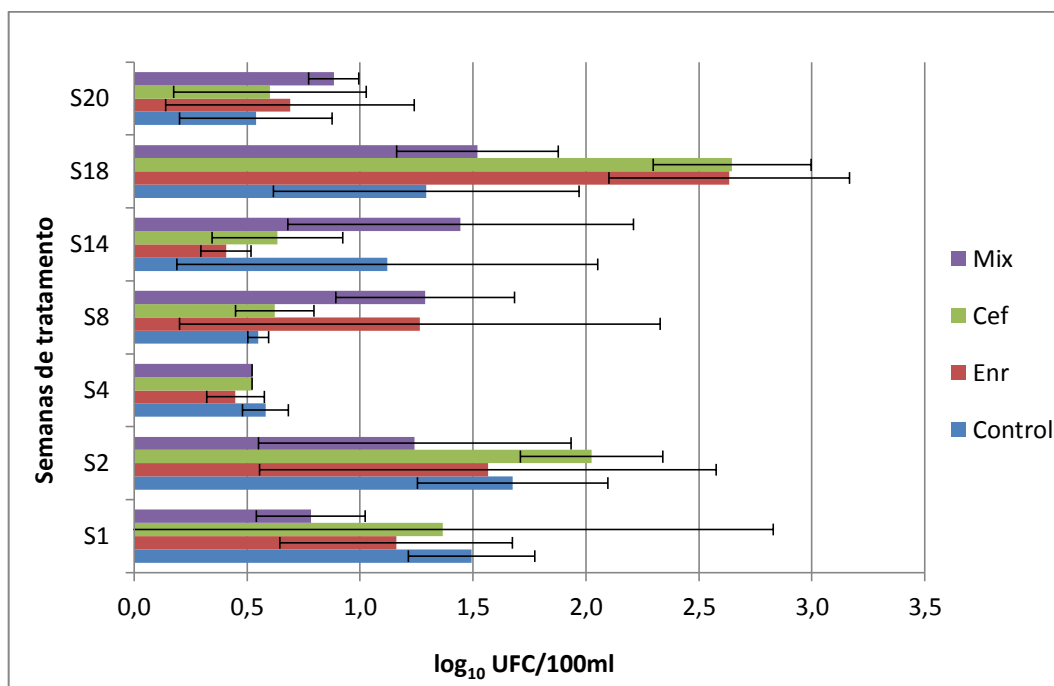


Figura 21 – Abundância de Coliformes resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente às Coliformes resistentes a ceftiofur (Figura 22), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 2 que apresenta valores superiores às restantes semanas, em que o sistema dopado com ceftiofur (Cef) possui o valor mais elevado com 2,24 \log_{10} UFC/100ml. Em geral não se observaram diferenças entre os diferentes microcosmos.

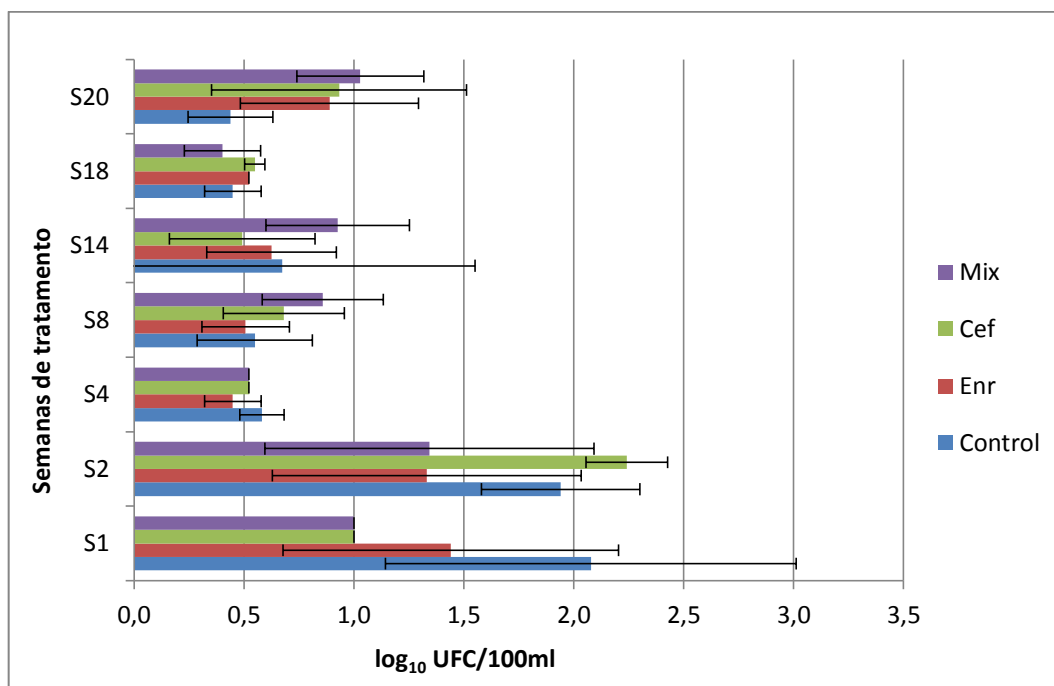


Figura 22 – Abundância de Coliformes resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente às Coliformes resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur (Figura 23), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 2 que apresenta valores superiores às restantes semanas, em que o sistema dopado com a mistura (Mix) possui o valor mais elevado com 1,33 \log_{10} UFC/100ml. Em geral não se observaram diferenças significativas entre os diferentes microcosmos.

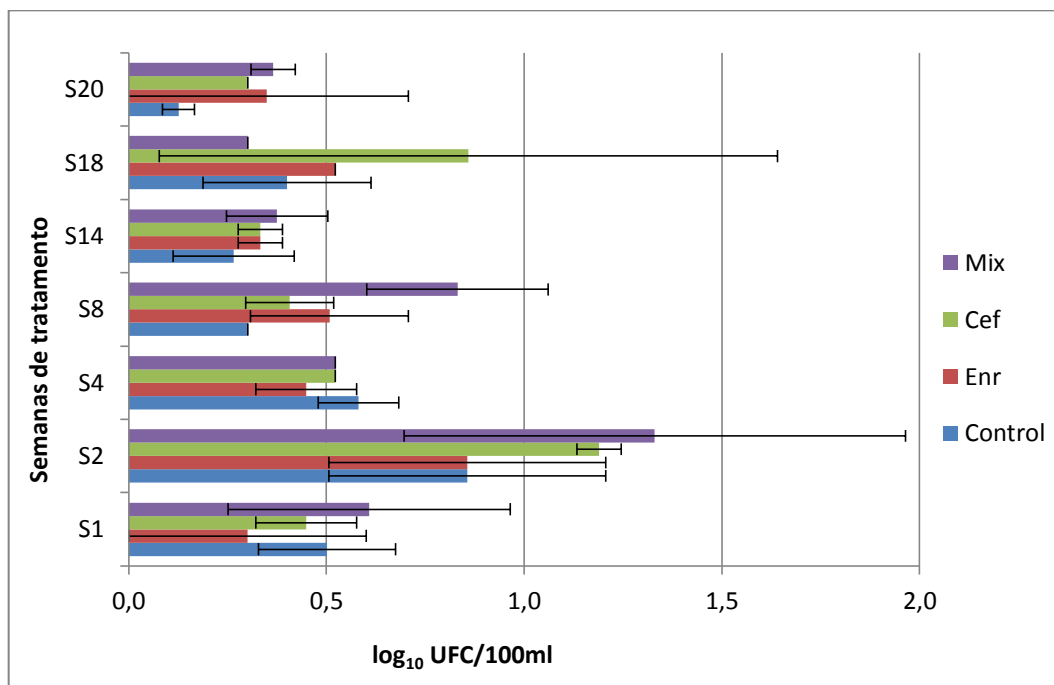


Figura 23 – Abundância de Coliformes resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

3.2.2.2 Percentagem de Resistência a Antibióticos

A percentagem de resistência de cada antibiótico foi calculada através da razão entre o número de colónias crescidas na presença e na ausência desse antibiótico.

Relativamente à percentagem de resistência a enrofloxacin (Figura 24), foram registados valores médios entre 0 e 35,77%, não se observando, em geral, diferenças entre tratamentos ou ao longo do tempo.

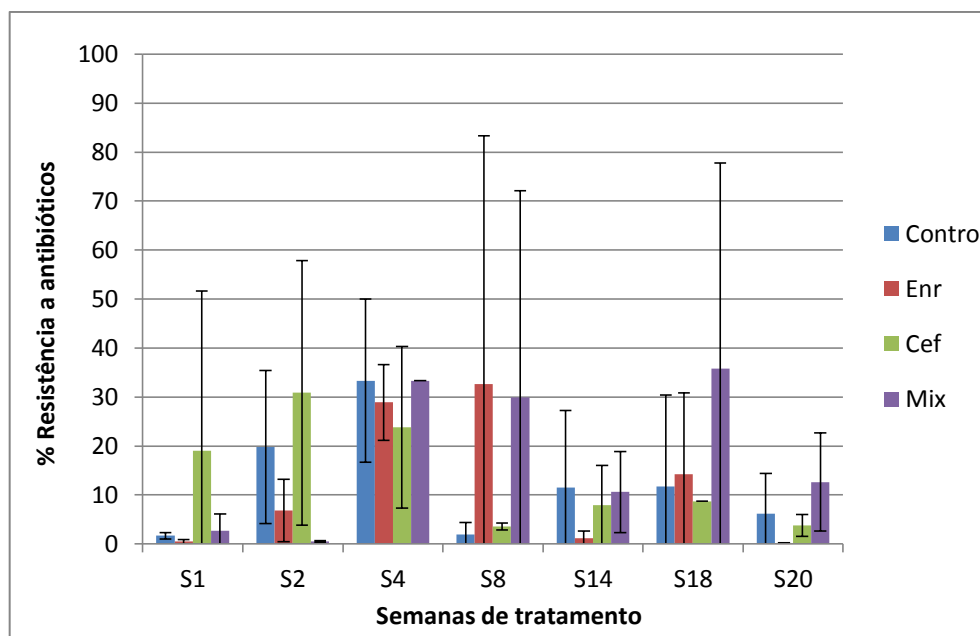


Figura 24 – Percentagem de resistência a enrofloxacin para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência a ceftiofur (Figura 25), os valores médios variaram entre 0 e 33,39%, tendo-se registado os valores mais elevados na semana 2 e os mais baixos na semana para a semana 4, em quase todos os microcosmos. Em geral não se observaram diferenças entre tratamentos.

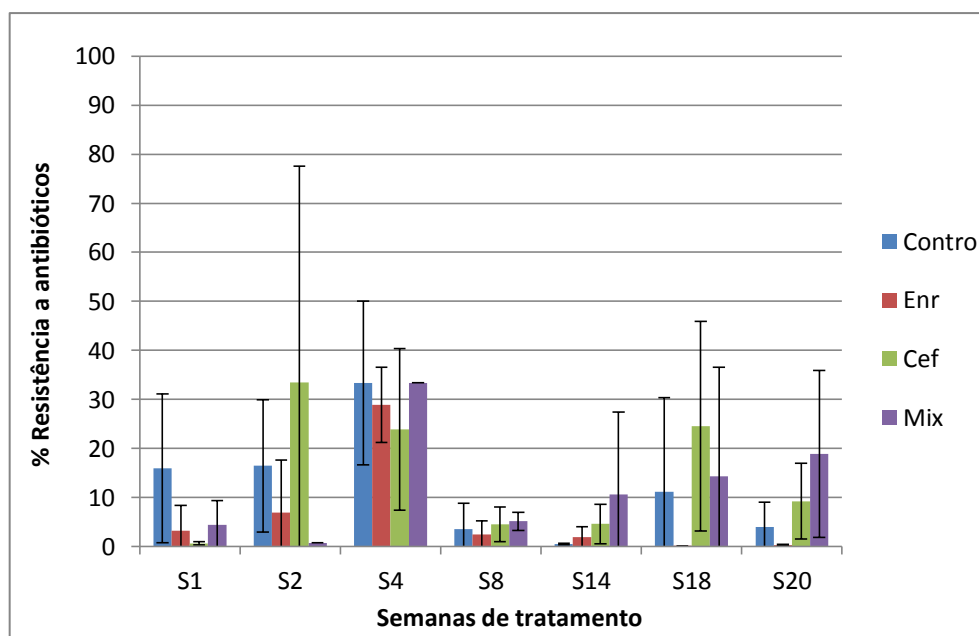


Figura 25 – Percentagem de resistência a ceftiofur para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência à mistura de enrofloxacina e ceftiofur (Figura 26), os valores médios variaram entre 0 e 33,33%, registando-se o valor mais elevado na semana 4. Em geral, não se observaram diferenças significativas entre tratamentos.

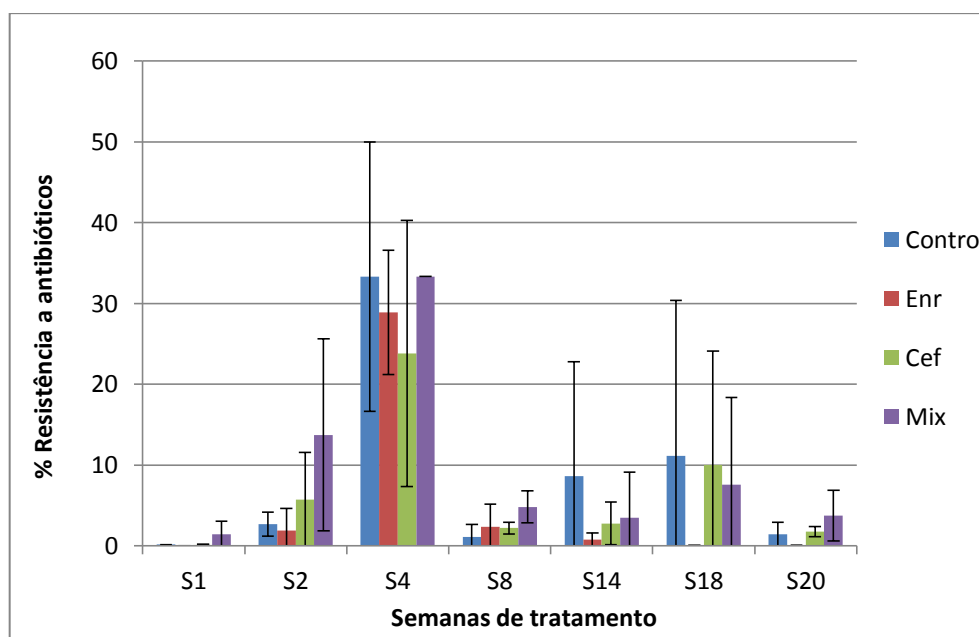


Figura 26 – Percentagem de resistência a mistura de enrofloxacina e ceftiofur para os Coliformes presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

3.2.2.3 *Eficiência de Remoção Bacteriana*

A taxa de remoção de Coliformes totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) foi calculada através da comparação dos dados relativos à abundância bacteriana no efluente inicial com os dados do efluente tratado, ao longo das várias semanas de tratamento.

Os valores de remoção não variaram muito ao longo das semanas de tratamento (Tabela 7), apresentando valores de remoção superiores a 98% para as Coliformes totais e para os resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) valores de remoção superiores a 99%.

Tabela 4 – Taxa de Remoção (máximo, mínimo e média) de Coliformes totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.

	Coliformes											
	Totais			Enr			Cef			Mix		
	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.
S1	98,52	92,28	95,69	99,73	84,80	95,54	99,85	95,76	98,57	99,17	97,44	98,38
S2	98,98	95,06	96,27	98,28	93,44	95,61	99,08	95,50	97,70	96,30	81,94	92,01
S4	99,86	99,57	99,77	99,52	99,35	99,44	97,11	96,11	96,64	99,04	98,70	98,88
S8	99,92	99,50	99,80	99,84	95,17	98,40	99,92	99,81	99,89	99,80	99,25	99,61
S14	99,89	99,59	99,76	99,88	97,26	98,81	99,95	99,80	99,89	99,73	99,66	99,70
S18	99,68	86,11	92,97	99,08	80,78	91,00	99,92	99,89	99,91	99,33	93,11	97,61
S20	99,88	94,90	98,57	99,99	99,97	99,98	99,96	99,82	99,87	99,87	99,74	99,79

3.2.3 Enterococos

3.2.3.1 Abundância em Unidades formadoras de Colônias (UFC/ml)

Relativamente às bactérias Enterococos totais (Figura 27), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 8 que apresenta valores inferiores em quase todos os microcosmos. Em geral não se observaram diferenças entre os diferentes microcosmos.

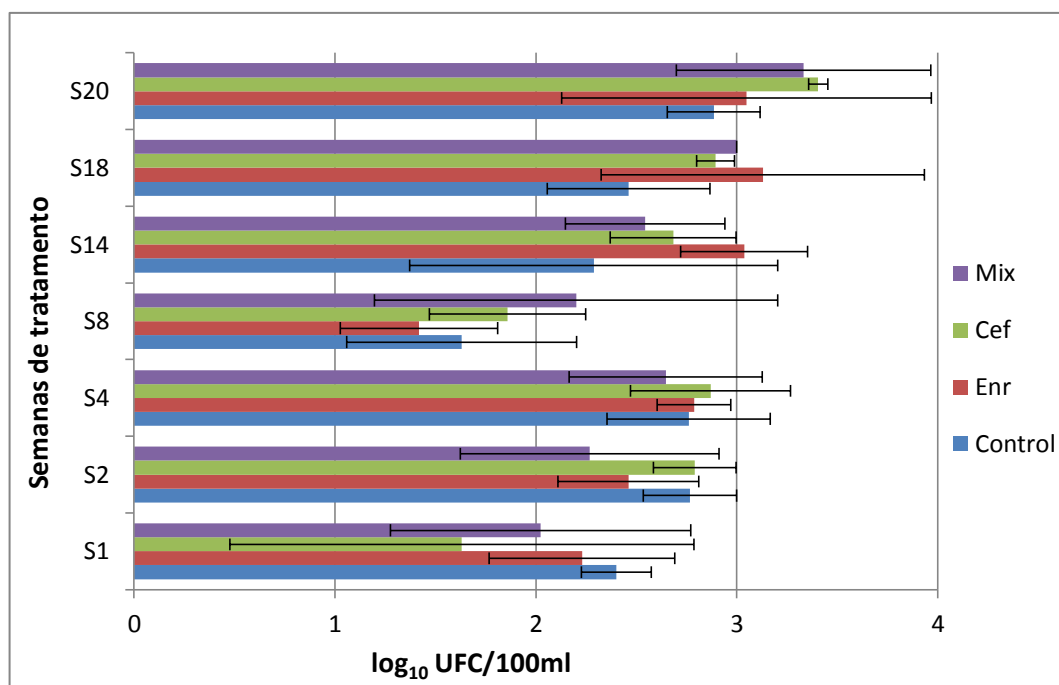


Figura 27 – Abundância de Enterococos totais nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente aos Enterococos resistentes a enrofloxacin (Figura 28), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 18 que apresenta valores inferiores às restantes semanas, em todos os sistemas.

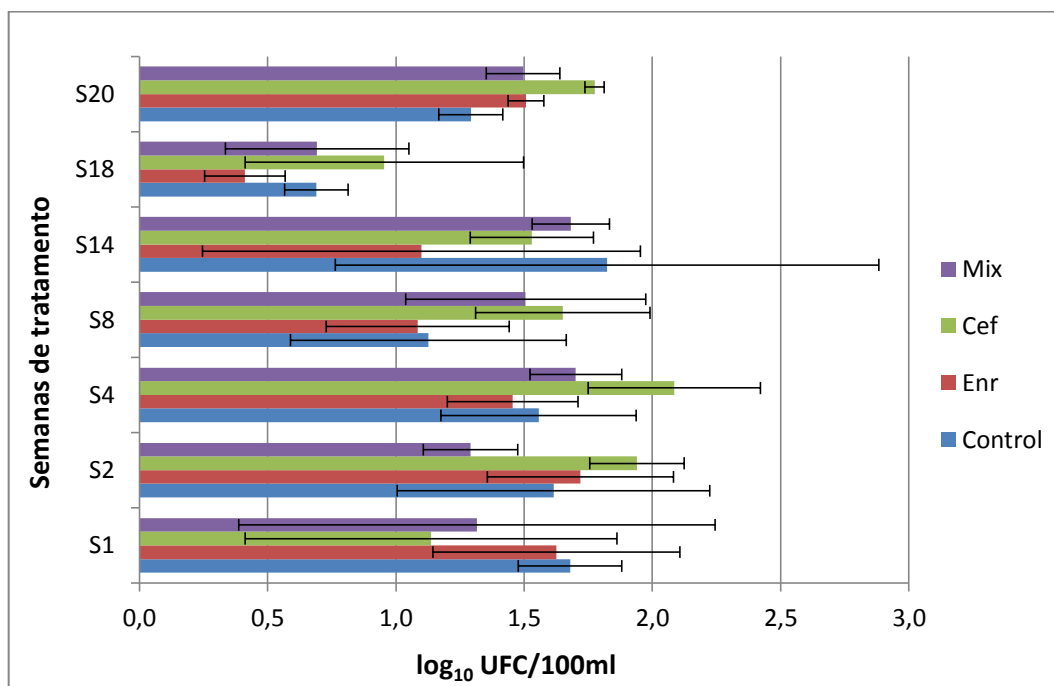


Figura 28 – Abundância de Enterococos resistentes a enrofloxacin nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente aos Enterococos resistentes a ceftiofur (Figura 29), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, com especial atenção para a semana 14 que apresenta valores superiores às restantes semanas, em todos os sistemas.

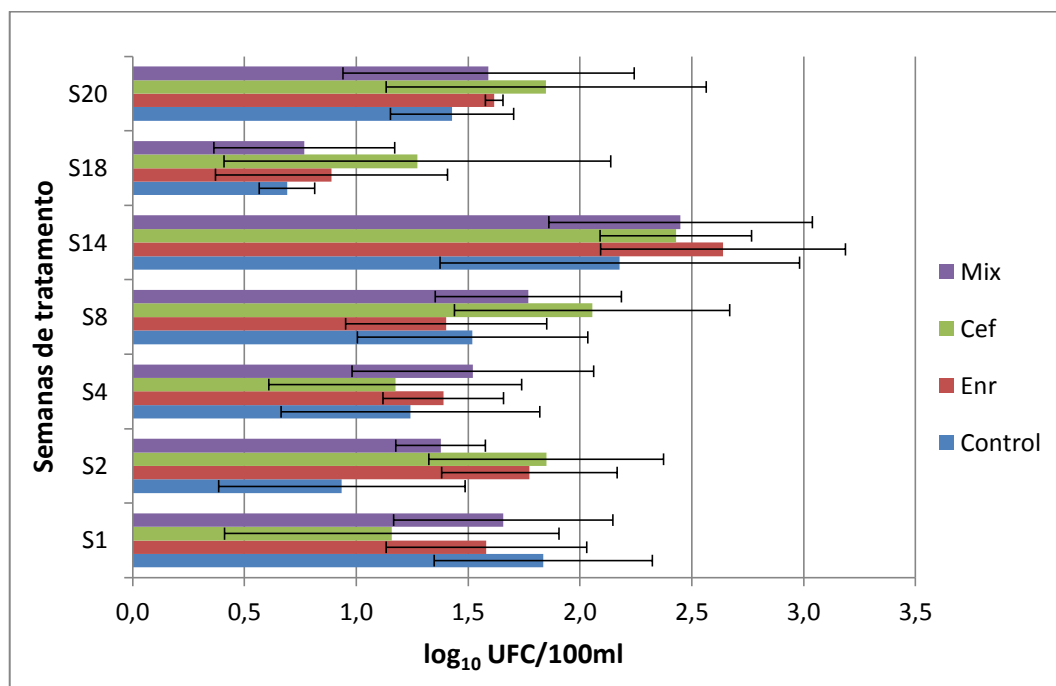


Figura 29 – Abundância de Enterococos resistentes a ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente aos Enterococos resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur (Figura 30), observa-se uma variação ao longo das semanas de tratamento, Não se observando, em geral diferenças entre os microcosmos expostos aos diferentes tratamentos.

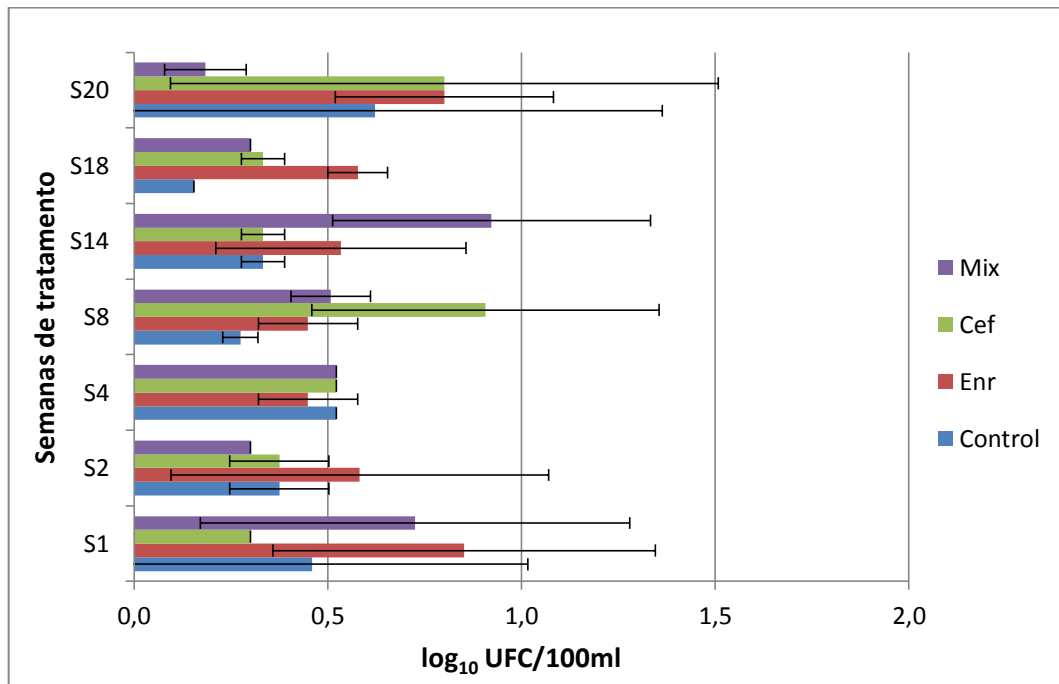


Figura 30 – Abundância de Enterococos resistentes a mistura de enrofloxacin e ceftiofur nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

3.2.3.2 Percentagem de Resistência a Antibióticos

A percentagem de resistência a cada antibiótico foi calculada através da razão entre o número de colónias crescidas na presença e na ausência desse antibiótico.

Relativamente à percentagem de resistência a enrofloxacin (Figura 31), foram registados valores entre médios entre 0 e 46,30%, registando-se os valores mais elevados na semana 8 para o sistema dopado com Cef.

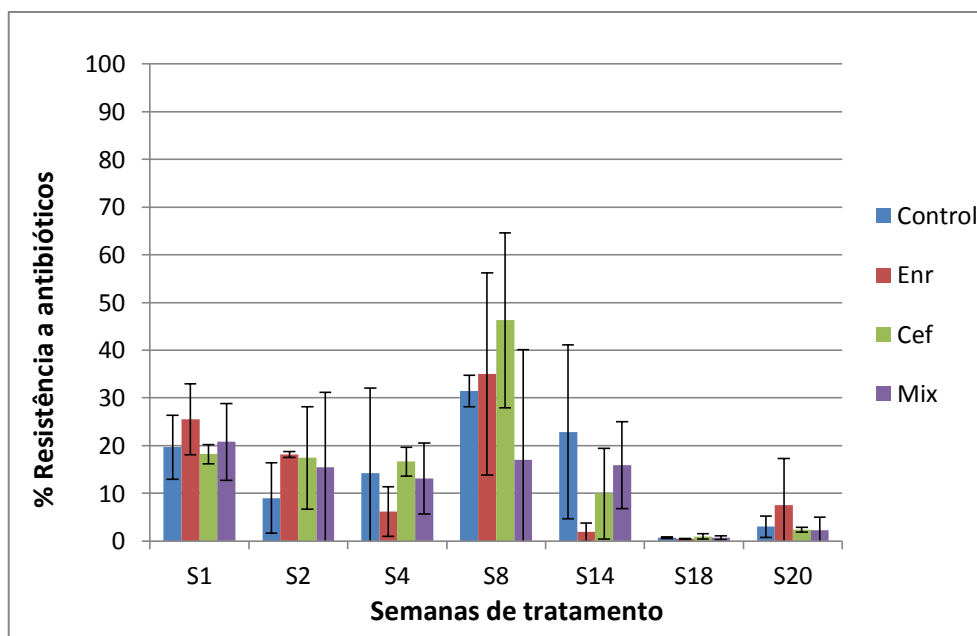


Figura 31 – Percentagem de resistência a enrofloxacin para os Enterococos presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacin, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacin e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência a ceftiofur (Figura 32), os valores médios variaram entre 0 e 80%, registando-se os valores mais elevados nas semanas 8 e 14, e não se observando, em geral, diferenças entre tratamentos.

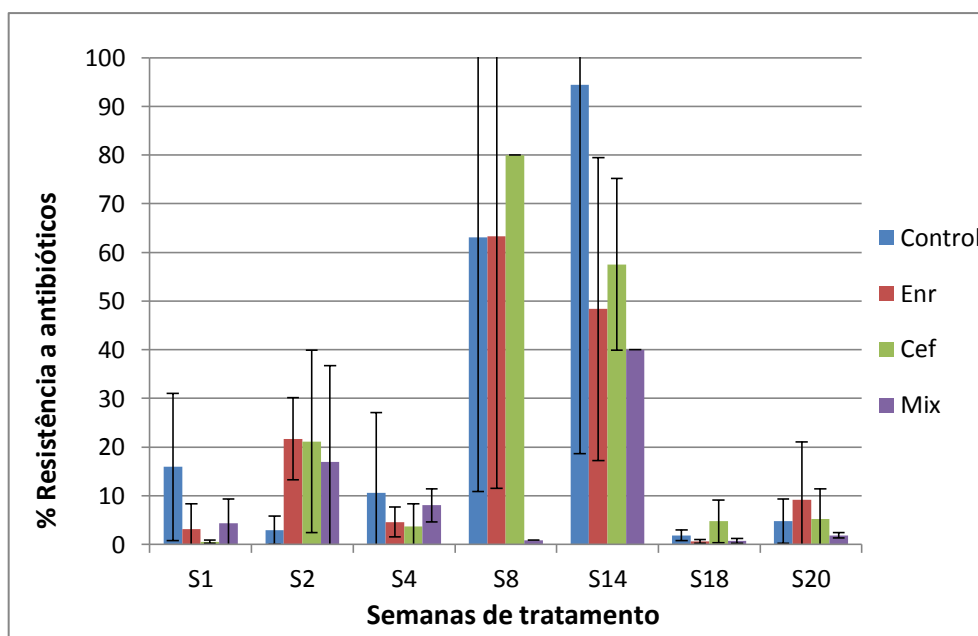


Figura 32 – Percentagem de resistência a ceftiofur para os Enterococos presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

Relativamente à percentagem de resistência à mistura de enrofloxacina e ceftiofur (Figura 33), os valores médios variaram entre 0 e 50,44%, registando-se os valores mais elevados na semana 1 e semana 8, não se observando diferenças entre tratamentos.

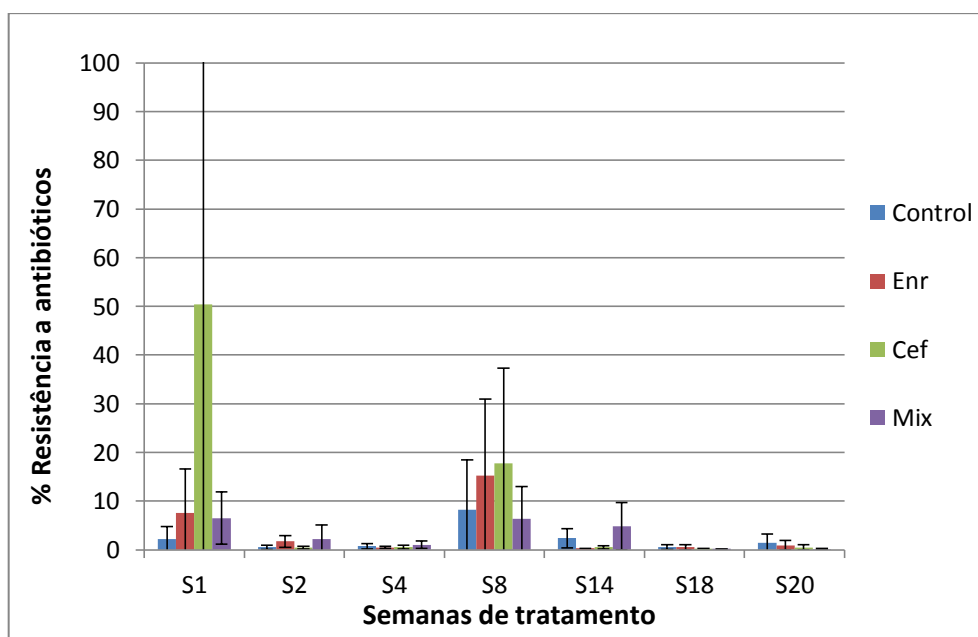


Figura 33 – Percentagem de resistência a mistura de enrofloxacina e ceftiofur para os Enterococos presentes nos efluentes tratados nos diferentes microcosmos ao longo das diferentes semanas (S1 – S20) de tratamento (Control – adição de efluente sem fármaco, Enr – adição de efluente dopado com enrofloxacina, Cef – adição de efluente dopado com ceftiofur, Mix – adição de efluente dopado com uma mistura de enrofloxacina e ceftiofur).

3.2.3.3 Eficiência de Remoção Bacteriana

A taxa de remoção de Enterococos totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix) foi calculada através da comparação dos dados relativos à abundância bacteriana no efluente inicial com os dados do efluente tratado, ao longo das várias semanas de tratamento.

Os valores de remoção não variaram muito (Tabela 9), apresentando valores de remoção superiores a 93% para as Enterococos totais, valores de remoção superiores a 97% para as resistentes a ceftiofur, valores de remoção superiores a 98% para as resistentes à mistura de enrofloxacin e ceftiofur (Mix), e valores de remoção superiores a 99% para as resistentes a enrofloxacin.

Tabela 5 – Eficiência de Remoção (máximo, mínimo e média) de Enterococcus totais e resistentes a antibióticos (Enr, Cef e Mix), ao longo das diferentes semanas de tratamento.

	Enterococcus											
	Totais			Enr			Cef			Mix		
	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.
S1	99,04	98,10	98,57	99,45	98,71	99,08	98,21	93,33	95,77	99,50	97,50	98,50
S2	98,62	97,10	97,86	99,39	97,29	98,34	98,73	89,80	94,27	99,75	99,25	99,50
S4	93,35	89,83	91,59	99,11	95,80	97,46	98,15	95,28	96,72	99,59	99,52	99,56
S8	99,79	97,59	98,69	99,52	98,27	98,90	99,39	96,56	97,98	99,27	95,90	97,59
S14	98,57	96,02	97,30	98,90	91,58	95,24	97,00	94,01	95,51	99,65	98,21	98,93
S18	97,04	77,65	87,35	99,84	99,07	99,46	99,48	95,53	97,51	98,57	96,19	97,38
S20	97,58	89,80	93,69	99,62	98,87	99,25	99,01	95,86	97,44	99,69	97,80	98,75

Capítulo 3

Discussão

4. Discussão

O objectivo desta dissertação era avaliar o potencial das ZHC para a remoção de bactérias resistentes a antibióticos de efluentes de suinicultura.

4.1 Abundância Bacteriana

Tendo em conta que um dos objectivos esperados de um sistema de tratamento de águas residuais é a eliminação de diversos grupos de bactérias, neste estudo foram analisados três desses grupos: bactérias Heterotróficas, Coliformes e Enterococos.

As bactérias Heterotróficas presentes nas águas residuais são organismos com tendência a crescer rapidamente, reconhecidas pela capacidade de se adaptarem facilmente e serem importantes vectores relativamente à resistência a antibióticos (Novo e Manaia, 2010). Comparando os valores de UFC obtidos para os diferentes grupos bacteriológicos presentes no efluente inicial e no efluente tratado pode-se dizer que em ambos as bactérias Heterotróficas foram o grupo mais abundante. Comparando as diferentes populações estudadas, é possível ainda observar que em geral as bactérias Heterotróficas sofrem uma menor redução do que os Coliformes e Enterococos.

Ferreira da Silva et al. (2006), para efluentes de ETAR afirmam que as Enterococos crescem lentamente e com menos abundância do que as Coliformes e as bactérias Heterotróficas. Neste estudo, apesar da origem do efluente ser diferente, também é possível observar que a ordem de crescimento foi Enterococos <Coliformes <Heterotróficas para o efluente de entrada e de saída.

4.2 Resistência Bacteriana

Novo e Manaia (2010) afirmam que a qualidade microbiológica do efluente tratado, nomeadamente em termos de BRA e a homogeneidade da remoção de organismos pertencentes a diferentes grupos de resistência, é amplamente influenciada pela eficiência do tratamento escolhido. De acordo com os resultados obtidos por esses autores, as bactérias Heterotróficas presentes nas águas residuais são um dos grupos mais relevantes em termos de resistência a antibióticos. No presente estudo observou-se que tanto no efluente de inicial como no efluente tratado, as bactérias Heterotróficas apresentam menos resistência do que as Coliformes e as Enterococos.

Segundo os resultados obtidos por *Manaia et al.* (2010), para ETAR urbanas, a taxa de resistência a enrofloxacin nas Coliformes foi superior nos efluentes tratados do que à entrada das ETAR. Apesar de no presente estudo a taxa de remoção de bactérias resistentes a antibióticos obtida ser, em geral, superior a 98%, foi possível observar que nas Coliformes a taxa de resistência para a enrofloxacin também se mostrou, para algumas semanas, superior no efluente tratado. Para as bactérias Heterotróficas e as Enterococos, contrariamente às Coliformes, as bactérias apresentam maior resistência ao ceftiofur após serem submetidas ao tratamento de ZHC.

Ferreira da Silva et al., (2006) encontraram evidências de que as Enterococos resistentes a antibióticos não são eliminadas durante o tratamento das águas residuais que possuam processos primários ou secundários de lamas activadas. Além de que pode ocorrer durante esses processos uma selecção positiva de bactérias resistentes a antibióticos.

Relativamente aos resultados obtidos no decorrer do presente trabalho, apesar da taxa de resistência das Enterococos ter sido em alguns casos superior após o tratamento de ZHC, também se obtiveram taxas de remoção superiores a 97% na presença de antibióticos (Enr, Cef e Mix), mostrando que os sistemas de ZHC possuem vantagens em relação aos sistemas de tratamento mais convencionais.

4.3 Remoção Bacteriana

De acordo com *Manaia et al.*, (2010) a densidade bacteriana nos efluentes tratados é influenciada pela taxa de remoção das mesmas. O tempo de retenção que é necessário para atingir a taxa de remoção máxima poderá contribuir para a fixação de populações bacterianas levando a um aumento na predominância de bactérias resistentes.

Manaia et al., (2010) ainda observaram que ETAR com taxas de remoção bacteriana perto dos 99% poderão ter um efeito atenuante na propagação de bactérias resistentes a antibióticos.

Sidrach-Cardona et al., (2013) afirmam que os valores obtidos para a remoção bacteriana em ZHC são superiores do que numa ETAR, chegando a atingir taxas entre os 90 – 99%. *Novo e Manaia* (2010) afirmam que anaeróbios de origem fecal, como as Coliformes e as Enterococos, são removidos mais eficientemente do que as bactérias Heterotróficas. E como se pode observar pelos resultados obtidos no presente estudo, para as Coliformes a taxa de remoção bacteriana é superior a 98% tanto na ausência (totais) como na presença de antibiótico; para as Enterococos a taxa de remoção mostra-se superior a 93% na ausência de antibióticos, e superior a 97% na presença de antibióticos (Enr, Cef e Mix). Relativamente às bactérias Heterotróficas, só na ausência (totais) e na mistura de antibióticos se obtiveram valores superiores a 99% de remoção bacteriana, quando testados sozinhos a enrofloxacin e o ceftiofur só foram capazes de obter taxas de remoção superiores a 51%. Mais uma vez, os resultados obtidos para remoção de bactérias resistentes a antibióticos presentes nos efluentes de suiniculturas, vêm comprovar que as ZHC se apresentam como uma solução economicamente viável e de fácil execução na obtenção de boas taxas de remoção bacteriana dos sistemas.

Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

A presente dissertação veio demonstrar o facto de as zonas húmidas construídas (ZHC) com escoamento vertical, utilizando como vegetação a planta *P. australis*, possuírem a capacidade para remover bactérias resistentes a antibióticos, tais como a Enrofloxacina e o Ceftiofur, das águas residuais de uma suinicultura.

Tendo em conta os resultados obtidos para as taxas de remoção de bactérias resistentes a antibióticos (BRA), é possível observar valores superiores a 51% para as bactérias Heterotróficas, superiores a 99% para as Coliformes e superiores a 97% para as Enterococos. O facto de a abundância ser inferior no efluente tratado demonstra a vantagem do uso destes sistemas para o tratamento de efluentes, demonstrando mais uma vez que o uso de ZHC para a recuperação de efluentes é de extrema importância.

De acordo com todos os resultados obtidos com a realização deste estudo pode-se afirmar que as ZHC são uma alternativa válida para a remoção de resistência a antibióticos, reduzindo o risco que a descarga de efluentes de suiniculturas acarretam para o meio ambiente, reforçando a relevância deste trabalho para a comunidade científica.

Referências Bibliográficas

- ❖ Alda, M. J. L. e Barceló, L.D. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Fundación Nueva Cultura del Agua. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente.
- ❖ Ávila, C., Pedescoll, A., Matamoros, V., Bayona, J. M. e García, J. (2010). "Capacity of a horizontal subsurface flow constructed wetland system for the removal of emerging pollutants: An injection experiment." *Chemosphere* 81 (9): 1137 – 1142.
- ❖ Baquero, F., Martínez, J.L., e Cantón, R. (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments." *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260 – 265.
- ❖ Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H. and Chen, L. (2008). "Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1202 (2): 173 – 180.
- ❖ Botequilha, J. R. M. (2013). Avaliação do Desempenho das Zonas Húmidas Construídas: Estudo de Caso Barroca D'Alva. Mestrado em Engenharia do Ambiente - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- ❖ Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Kay P., Blackwel, P. A., Pemberton, E. J. e Croxford, A. (2003). "Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment." *Toxicology Letters* 142(3): 207 – 218.
- ❖ Calheiros, C. S. C., Rangel, A. O. S. S. e Castro, P. M. L. (2006). "Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater." *Water Research* 41: 1790 – 1798.
- ❖ Calheiros, C. S. C., Rangel, A. O. S. S. and Castro, P. M. L. (2007). "Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater." *Water Research* 41 (8): 1790 – 1798.
- ❖ Carvalho, P. N., Araújo, J.L., Mucha, A.P., Basto, M.C. e Almeida, C.M.R. (2013). "Potential of constructed wetlands microcosms for the removal of veterinary pharmaceuticals from livestock wastewater." *Bioresource Technology* 134: 412 – 416.
- ❖ Carvalho, P. N. (2012). Implementation of methodologies for removal of veterinary pharmaceuticals residues from wwtps effluents of the livestock industry. Ph.D. degree

in Chemistry, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

- ❖ Chen, H. e Zhang, M. (2013). "Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China." *Environment International* 55: 9 –14.
- ❖ Council, T. I. T. R. (2003). Technical and Regulatory Guidance Document for Constructed Wetlands.
- ❖ Deng, Y., Zhang, Y., Gao, Y., Li, D., Liu, R., Liu, M., Zhang, H., Hu, B., Yu, T. e Yang, M. (2012). "Microbial Community Compositional Analysis for Series Reactors Treating High Level Antibiotic Wastewater." *Environmental Science & Technology* 46: 795 – 801.
- ❖ Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Teixeira, D. M., Dias, C. B. e Pinto, A. P. (2010). "Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha spp.* and LECA." *Bioresource Technology* 101: 886 – 892.
- ❖ Falcone-Dias, M. F., Vaz-Moreira, I. e Manaia, C.M. (2012). "Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria." *Water Research* 46: 3612 – 3622.
- ❖ Fent, K., Weston, A. e Caminada, D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." *Aquatic Toxicology* 76(2): 122 – 159.
- ❖ Fernandes, J. P., Almeida, C. M. R., Pereira, A. C., Ribeiro, I. L., Reis, I., Carvalho, P., Basto, M. C. P. e Mucha, A. P. (2015). "Microbial community dynamics associated with veterinary antibiotics removal in constructed wetlands microcosms." *Bioresource Technology* 182: 26 – 33.
- ❖ Ferreira da Silva, M., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R.A.R., Nunes, O.C. e Manaia, C.M., (2006). "Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant." *FEMS Microbiology Ecology* 55: 322 – 329.
- ❖ Gagnon, C., Turcotte, P., Trepanier, S., Gagne, F. e Cejka, P. J. (2014). "Impacts of municipal wastewater oxidative treatments: changes in metal physical speciation and bioavailability." *Chemosphere* 97: 86 – 91.
- ❖ Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C. e Jørgensen, S. E. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review." *Chemosphere* 36 (2): 357 – 393.
- ❖ Helt, C. D., Weber, K.P., Legge, R.L. e Slawson, R.M. (2012). "Antibiotic resistance

profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms." *Ecological Engineering* 39: 113 – 122.

- ❖ Hoagland, D. R. e Arnon, D.I. (1950). "The water-culture method for growing plants without soil." *Alabama Agricultural Experiment Station* 347: 1 – 32.
- ❖ Joy, S. R., Snow, D. D., Gilley, J. E., Woodbury, B. e Bartelt-Hunt, S. L. (2014). "Fate of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in simulated swine manure storage." *Science of The Total Environment* 481: 69 – 74.
- ❖ Kim, S. e Aga, D. S. (2007). "Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants." *Journal of Toxicology & Environmental Health Part B* 10 (8): 559 – 573.
- ❖ Leclerc, H. e Da Costa, M. S. (1998). *Microbiology of Natural Mineral Waters. Technology of Bottled Water*. D. a. D. Senior, N. Sheffield, England, Sheffield Academic Press: 223 – 273.
- ❖ Leto, C., Tuttolomondo, T., Bella, S. L., Leone, R. e Licata, M. (2013). "Effects of plant species in a horizontal subsurface flow constructed wetland – phytoremediation of treated urban wastewater with *Cyperus alternifolius* L. and *Typha latifolia* L. in the West of Sicily (Italy)." *Ecological Engineering* 61: 282 – 291.
- ❖ Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J. e Tan, S. K. (2014). "A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism." *Science of The Total Environment* 468-469: 908 – 932.
- ❖ Liu, L., Liu, C., Zheng, J., Huang, X., Wang, Z., Liu, Y. e Zhu, G. (2013). "Elimination of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes from swine wastewater in the vertical flow constructed wetlands." *Chemosphere* 91 (8): 1088 – 1093.
- ❖ López-Peñalver, J. J., Sánchez-Polo, M., Gómez-Pacheco, C. V. e Rivera-Utrilla, J. (2010). "Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/H₂O₂ oxidation processes." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85 (10): 1325 – 1333.
- ❖ Łuczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S. e Olańczuk-Neyman, K. (2010). "Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant." *Water Research* 44: 5089 – 5097.
- ❖ Ma, J., Lin, H., Sun, W., Wang, Q., Yu, Q., Zhao, Y. e Fu, J. (2014). "Soil microbial

systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination." *Environmental Science and Pollution Research* 21: 7436 – 7448.

- ❖ Manaia, C. M., Novo, A., Coelho, B. e Nunes, O. C. (2010). "Ciprofloxacin Resistance in Domestic Wastewater Treatment Plants." *Water, Air, & Soil Pollution* 208: 335 – 343.
- ❖ Martinez, J. L. (2009). "Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants." *Environmental Pollution* 157 (11): 28893 – 22902.
- ❖ Matamoros, V. e Bayona, J. M. (2006). "Elimination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands." *Environmental Science & Technology* 40 (18): 5811 – 5816.
- ❖ Matamoros, V. e Salvadó, V. (2012). "Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants." *Chemosphere* 86 (2): 111 – 117.
- ❖ Novo, A. e Manaia, C.M. (2010). "Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 1157 – 1166.
- ❖ Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C. e Manaia, C. M. (2013). "Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater." *Water Research* 47: 1875 – 1887.
- ❖ Pruden, A., PEI, R., Storteboom, H. e Carlson, K. H. (2006). "Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado." *Environmental Science & Technology* 40: 7445 – 7450.
- ❖ Shao, B., Chen, D., Zhang, J., Wu, Y. e Sun, C. (2009). "Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater." *Journal of Chromatography A* 1216 (47): 8312 – 8318.
- ❖ Sidrach-Cardona, R. e Bécares, E. (2013). "Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands." *Ecological Engineering* 50: 107 – 111.
- ❖ Sirés, I. e Brillas, E. (2012). "Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A

review." Environment International 40 (0): 212 – 229.

- ❖ Villa, D. H. (2012). Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacêuticos en la cuenca del rio Biobío, region del Biobío, Chile. Grado de Magister en Ciencias de la Ingenieria mención recursos y medio ambiente hidrico. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Civil.
- ❖ Vymazal, J. e Kröpfelová, L. (2008). "A three-stage experimental constructed wetland for treatment of domestic sewage: First 2 years of operation." Ecological Engineering 37: 90 - 98.
- ❖ Vymazal, J. A. N. (2011). "Removal of Heavy Metals in a Horizontal Sub-Surface Flow Constructed Wetland." Journal of Environmental Science and Health, Part A, 40 (6 - 7): 1369 – 1379.
- ❖ Watkinson, A. J., Micalizzi, G. B., Bates, J. B. e Costanzo, S. D. (2007). "Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system." Applied and Environmental Microbiology 73 (17).
- ❖ Zhang, D., Gersberg, R. M., Ng, W. J. e Tan, S. K. (2014). "Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: a review." Environmental Pollution 184: 620 – 639.
- ❖ Zhang, T., Xu, D., He, F., Zhang, Y. e Wu, Z. (2012). "Application of constructed wetland for water pollution control in China during 1990 – 2010." Ecological Engineering 47: 189 – 197.
- ❖ Zhou, J. L., Zhang, Z.L., Banks, E., Grover, D. e Jiang, J.Q., (2009). "Microbial community dynamics associated with veterinary antibiotics removal in constructed wetlands microcosms." Journal of Hazardous Materials 166 (2 - 3): 655 – 661.

